

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11)特許出願公表番号

特表平7-508881

第1部門第1区分

(43)公表日 平成7年(1995)10月5日

| | | | |
|-----------------------------------|---------|----------|------------------|
| (51)Int.Cl. ⁴ | 識別記号 | 庁内整理番号 | F I |
| C 1 2 P 21/02 | Z N A C | 9282-4 B | |
| C 1 2 N 1/19 | | 8828-4 B | |
| 9/90 | | 9152-4 B | |
| 15/09 | | 9281-4 B | C 1 2 N 15/ 00 A |
| 審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 37 頁) 最終頁に続く | | | |

| | | | |
|--------------|-----------------------------|---------|--|
| (21)出願番号 | 特願平6-501587 | (71)出願人 | メルク エンド カンパニー インコーポ レーテッド |
| (86) (22)出願日 | 平成 5 年(1993) 6 月 2 日 | | アメリカ合衆国、ニュージャージー |
| (85)翻訳文提出日 | 平成 6 年(1994)12月12日 | | 07065, ローウエイ, イースト リンカー ン アヴェニュー 128 |
| (86)国際出願番号 | P C T / U S 9 3 / 0 5 3 1 8 | (71)出願人 | ユニバーシティー・オブ・ケント・アッ ト・カンタベリー |
| (87)国際公開番号 | W O 9 3 / 2 5 6 7 6 | | イギリス国、ケント・シー・テュー・2・ 7・エヌ・ゼット、カンタベリー、ザ・レ ジストリー (番地なし) |
| (87)国際公開日 | 平成 5 年(1993)12月23日 | (74)代理人 | 弁理士 川口 義雄 (外 2 名) |
| (31)優先権主張番号 | 9 0 1, 7 1 3 | | |
| (32)優先日 | 1992年 6 月12日 | | |
| (33)優先権主張国 | 米国 (U S) | | |

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 サッカロミセスセレビシアエによるジスルフィド結合をもつ組換えタンパク質の産生を増加させる方法

(57)【要約】

酵母によって産生されるジスルフィド結合をもつ組換えタンパク質、特に組換え分泌タンパク質の収率を増加させる方法を開示する。タンパク質ジスルフィドイソメラーゼ (P D I) 酵素は分泌及び細胞表面タンパク質におけるジスルフィド結合の形成を触媒する。ここでは、ヒト P D I 又は酵母 P D I を調節的に過剰産生する酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の組換え株の構築を開示する。これらの株は、治療面で潜在的に重要なジスルフィド結合をもつタンパク質を極めて多量に分泌する。これらの株は、ジスルフィド結合をもつ種々のタンパク質の産生を増加させる可能性を有する。

請求の範囲

1. ジスルフィド結合をもつ組換えタンパク質の製造方法であって、
 - (a) 組換え宿主内で組換えタンパク質ジスルフィドイソメラーゼを発現させるステップ、及び
 - (b) 前記組換え宿主内で、ジスルフィド結合をもつ一つ以上のタンパク質をコードする一つ以上の組換え遺伝子を発現させるステップ
 を含むことを特徴とする前記方法。
2. ステップ(a)でタンパク質ジスルフィドイソメラーゼ酵素を産生する組換え宿主が、タンパク質ジスルフィドイソメラーゼ酵素をコードする組換え発現カセットのコピーを一つ以上含む請求項1に記載の方法。
3. タンパク質ジスルフィドイソメラーゼをコードする発現カセットが宿主細胞ゲノムに組み込まれる請求項2に記載の方法。
4. タンパク質ジスルフィドイソメラーゼをコードする発現カセットが直接的複製プラスミド上に含まれている請求項2に記載の方法。
11. 酵母が *Saccharomyces cerevisiae* 又は *Cryptococcus neoformans* 科の種の株である請求項10に記載の方法。
12. 酵母が *Saccharomyces* 属の種である請求項11に記載の方法。
13. 酵母が *Saccharomyces cerevisiae* である請求項12に記載の方法。
14. ステップ(b)の組換え遺伝子がアンチスタレンである請求項1に記載の方法。
15. ステップ(b)の組換え遺伝子がマダニ抗凝血タンパク質である請求項1に記載の方法。
16. 組換えタンパク質ジスルフィドイソメラーゼが酵母タンパク質ジスルフィドイソメラーゼである請求項1に記載の方法。
17. 組換えタンパク質ジスルフィドイソメラーゼが哺乳動物タンパク質ジスルフィドイソメラーゼである請求項1に記載の方法。
18. 組換えタンパク質ジスルフィドイソメラーゼがヒトタンパク質ジスルフィドイソメラーゼである請求項17に記載の方法。

5. 組換えタンパク質ジスルフィドイソメラーゼが、一つ以上のプラスミド上に含まれている一つ以上の発現カセットでコードされ、ジスルフィド結合をもつ一つ以上のタンパク質をコードする組換え遺伝子が、一つ以上のプラスミド上に含まれている請求項1に記載の方法。
6. 組換えタンパク質ジスルフィドイソメラーゼが、一つ以上のプラスミド上に含まれている一つ以上の発現カセットでコードされ、ジスルフィド結合をもつ一つ以上のタンパク質をコードする組換え遺伝子が宿主細胞ゲノムに組み込まれる請求項1に記載の方法。
7. ステップ(b)のジスルフィド結合をもつ一つ以上のタンパク質をコードする組換え遺伝子が宿主細胞ゲノムに組み込まれる請求項1に記載の方法。
8. タンパク質ジスルフィドイソメラーゼをコードする発現カセット及び組換え遺伝子が同一プラスミド上に含まれている請求項5に記載の方法。
9. ステップ(a)の組換え宿主が哺乳動物である請求項1に記載の方法。
10. ステップ(a)の組換え宿主が酵母である請求項1に記載の方法。

19. ジスルフィド結合をもつ組換えタンパク質の製造方法であって、
 - (a) 組換え酵母宿主細胞内で組換えタンパク質ジスルフィドイソメラーゼを産生するステップ、及び
 - (b) 前記組換え宿主内で、分断ジスルフィド結合をもつ一つ以上のタンパク質をコードする一つ以上の組換え遺伝子が発現させるステップ
 を含むことを特徴とする前記方法。
20. 組換えタンパク質ジスルフィドイソメラーゼが酵母タンパク質ジスルフィドイソメラーゼである請求項19に記載の方法。
21. 組換えタンパク質ジスルフィドイソメラーゼが哺乳動物タンパク質ジスルフィドイソメラーゼである請求項19に記載の方法。
22. 組換えタンパク質ジスルフィドイソメラーゼがヒトタンパク質ジスルフィドイソメラーゼである請求項21に記載の方法。
23. ステップ(a)でタンパク質ジスルフィドイソメラーゼ酵素を産生する組換え酵母宿主が、タンパク質ジスルフィドイソメラーゼをコードする組換え発現カセットのコ

ピーを一つ以上含む請求項19に記載の方法。

24. タンパク質ジスルフィドイソメラーゼをコードする発現カセットが酵母宿主細胞ゲノムに挿入される請求項23に記載の方法。

25. タンパク質ジスルフィドイソメラーゼをコードする発現カセットが自律的複製プラスミド上に含まれている請求項23に記載の方法。

26. 組換えタンパク質ジスルフィドイソメラーゼが、一つ以上のプラスミド上に含まれている一つ以上の発現カセットでコードされ、ジスルフィド結合をもつタンパク質をコードする組換え遺伝子が一つ以上のプラスミド上に含まれている請求項19に記載の方法。

27. タンパク質ジスルフィドイソメラーゼをコードする発現カセット及び組換え遺伝子が同一プラスミド上に含まれている請求項19に記載の方法。

28. ジスルフィド結合をもつ一つ以上のタンパク質を発現させるために、組換え酵母宿主を30℃以下の温度で増殖する請求項19に記載の方法。

29. ジスルフィド結合をもつ一つ以上のタンパク質を発現させるために、組換え酵母を約20℃～25℃の温度で

増殖する請求項28に記載の方法。

30. ジスルフィド結合をもつタンパク質がアンチオキシダンである請求項28に記載の方法。

31. ジスルフィド結合をもつタンパク質がマジン抗凝血タンパク質である請求項28に記載の方法。

32. 組換えタンパク質ジスルフィドイソメラーゼを産生する酵母 Saccharomyces cerevisiae の株。

33. 組換えタンパク質ジスルフィドイソメラーゼがヒトタンパク質ジスルフィドイソメラーゼである請求項32に記載の酵母株。

34. 組換えタンパク質ジスルフィドイソメラーゼが酵母タンパク質ジスルフィドイソメラーゼである請求項32に記載の酵母株。

明 細 書

サッカロミセスセレビシアエによるジスルフィド結合をもつ組換えタンパク質の産生を増加させる方法

発明の背景

タンパク質ジスルフィドイソメラーゼ(PDI)は、分泌タンパク質及び細胞表面タンパク質におけるジスルフィド結合の形成に関わる酵素である。哺乳動物PDIの単離された(cousser ved)「チオレドキシン様」活性部位を検出するように設計されたオリゴヌクレオチド(WC G G C K) (配列番号: 1)を用いて、本発明者らは下等真核生物 Saccharomyces cerevisiae からPDIをコードする遺伝子を単離した。クローニングした遺伝子のヌクレオチド配列及び推定翻訳物は、分子量59,000及びpI 4.1の530アミノ酸からなるタンパク質を予測させるが、これらは哺乳動物PDIの物理的性質である。また、アミノ酸配列は哺乳動物及び鳥類のPDI配列に対して80～82%の同一性と53～56%の類似性を示し、全体的構造が極めて類似しており、特に、各々が反応性である二つの100残基セグメ

ントが存在する。哺乳動物及び鳥類のPDIに対する最も大きな相同性は、両者された「チオレドキシン様」活性部位を含む領域(a, a')にある。N末端領域は機能可能な分送シグナル配列の特性を有しており、C末端の4個のアミノ酸(-HDEI) (配列番号: 2)は、該タンパク質がS. cerevisiae小胞体(E. R.)の成分であるということと合致している。この遺伝子(PDI1と称する)の複製のコピーを有する形質転換体は10倍のPDI活性レベルを有し、予測された分子量のタンパク質を過剰発現する。PDI1遺伝子は酵母ゲノム内で非反復性であり、正常期細胞には存在せず、また熱誘導もできない。単一の1.8kb転写体をコードする。PDI1遺伝子の破壊はハプロ致死性(haplo-lethal)であり、これは該遺伝子の産物が生育能力(viability)にとって必須のものであることを意味する。

チオール:ジスルフィド交換反応を触媒する酵素であるタンパク質ジスルフィドイソメラーゼ(PDI)は、分泌細胞のE. R. 内腔(lumen)の主な常在タンパク質成分である。該酵素の組織分布、細胞内の位置及び発現密度に関して立証された一連の事実は、該酵素が分泌タンパ

運された。例えば、PDIが、E. R. 内の新生 (nascent) すなわち新合成 (nascent-synthesized) プロコラーゲンポリペプチドの主な翻訳後修飾を触媒する阻害体 α, β -酵素プロリル-4-ヒドロキシラーゼの β サブユニットとして作用するという事実が立証されている (Pihlajaniemiら, 1987, 前出引用文献; Kojimaら, 1987, J. Biol. Chem., 262, pp. 6447-49)。また、PDIが同様の翻訳のN-グリコシル化のシステムに関与することを示唆する事実もあり (Geetha-Habibら, 1988, Cell, 54, pp. 63-68)、最近では、該酵素が、トリグリセリドを新生分泌リポタンパク質に変換する複合体に関与しているという説も出ている (Whittamら, 1990, J. Biol. Chem., 265, pp. 9800-7)。このように、PDIは分泌タンパク質の同時翻訳及び翻訳後修飾で複数の機能を果たし得る (Freedman, 1989, Cell, 51, pp. 1069-72)。

哺乳動物分泌タンパク質の大多數は、複数の分子内及び/又は分子間ジスルフィド結合を有している。非限定的例

がある。通常は、天然タンパク質の生成速度及び表現可能な最適収率はどちらも、分子内ジスルフィド結合の増加に伴って低下する。この問題は、各ドメインが折り畳まれてそれぞれの天然ジスルフィド結合を独立して形成しなければならない複数のジスルフィド結合ドメインを含むタンパク質 (例えば組織プラスミノーゲン活性化因子) ではより重大である。

in vivoのジスルフィド結合形成プロセスは、翻訳と同時に、又は極めて早期の翻訳後事象として発起する。哺乳動物細胞のE. R. 内腔の翻訳及び新合成分泌タンパク質の研究では、天然ジスルフィド結合が既に形成されていることが判明している。in vivoのプロセスは、分泌細胞内に豊富に存在するタンパク質であり小胞体の内腔面 (luminal face) に局在する酵素、タンパク質ジスルフィドイソメラーゼによって触媒されると思われる (Freedman, R. B., 1984, Trend in Biochemical Sciences, 9, 438-441)。この酵素はin vitroで、広範囲のタンパク質基質においてチオール:タンパク質-ジスルフィド交換反応を触媒し、天然タンパク質ジスルフィ

ド形成の細胞触媒に必要とされる特徴を有する (Freedman, R. B.ら, 1984, Biochem. Soc. Trans., 12, 939-942)。該酵素の役割を明らかにする別の事項としては、(i) 該酵素の組織分布がジスルフィド結合をもつ分泌タンパク質の合成のそれと合致するという事実 [Brockway, B. E.ら, 1980, Biochem. J., 191, 873-875]、及び(ii) 多くの系で、存在する酵素の量が、ジスルフィド結合をもつ分泌タンパク質の合成速度の生理学的変化に平行して変化するという事実 (Brockway, B. E.ら, 1980, Biochem. J., 191, 873-876; Freedman, R. B.ら, 1983, "Functions of Glutathione: Biochemical, Physiological, Toxicological & Clinical Aspects", A. Larsson, S. Orrenius, A. Holmgren & B. Mannervik編, Raven Press, New York, pp. 271-282; Paver, J. L.ら, 1989, FEBS Letters, 242, pp. 857-

単一の折り畳みドメインを有するジスルフィド結合をもつタンパク質は通常、正確にジスルフィド結合した状態を最適な収率で形成するために、完全に還元、酸化し、次いでin vivoで再生することができる。このプロセスでは、ゆっくり還元化して天然のジスルフィド結合を生成する多くの機にジスルフィド結合した形態の融合集団が迅速に形成される。該プロセスは、チオール/ジスルフィド酸化還元機構 (例えばGSH及びGSSG) 及びアルカリ性pHによって触媒される。沈殿及び膜間ジスルフィド形成を防止するためには、タンパク質濃度を低くする必

要がある。通常は、天然タンパク質の生成速度及び表現可能な最適収率はどちらも、分子内ジスルフィド結合の増加に伴って低下する。この問題は、各ドメインが折り畳まれてそれぞれの天然ジスルフィド結合を独立して形成しなければならない複数のジスルフィド結合ドメインを含むタンパク質 (例えば組織プラスミノーゲン活性化因子) ではより重大である。

382) が挙げられる。

該酵素の発現は、多くの動物源 [Lambert, N. 及び Freedman, R. B., 1983, Biochem. J., 213, pp. 225-234] 及びコムギ [de Azavedo, G. M. V. ら, 1983, Biochem. Soc. Trans., 12, 1043] で説明されており、分子特性及び動力学的特性の顕著な保存が観察された [Freedman, R. B. ら, 1984, Biochem. Soc. Trans., 12, pp. 939-942; Brockway, B. E. 及び Freedman, R. B., 1984, Biochem. J., 219, 51-59]。しかしながら、該酵素は、高等真核生物又は細菌においてはまだ十分に研究されていない。少なくとも一部の酵母分泌タンパク質(例えばキラー毒素)はジスルフィド結合を含んでいるため、酵母と高等真核生物との間の、分泌に関与するメカニズム及び分子成分の高度の相同性は、該酵素又は類似体が酵母内に存在することを強く示唆させる。

商業的に重要な哺乳動物タンパク質の発現のための万能宿主 (versatile host) としての酵母の使

通常レベルの PDI を産生する宿主細胞と比べて実質的に増加する。

図面の簡単な説明

第1図は、マルチコピープラスミド上に酵母 PDI をコードする遺伝子を有する *S. cerevisiae* 形質転換体の無細胞溶解放の SDS-PAGE 分析を示している。

第2図は、「COMPARE」及び「DOTPLOT」ソフトウェア (UWGCG) を用いた酵母 PDI とラット PDI との間のドットプロットアラインメント (dot plot alignment) を示している。哺乳動物 PDI のドメイン構造は同じ規模で前述アラインメントの下に示されている。

第3図は、酵母 PDI 上遊位子の発現に関するストラテジー及び結果を示している。パネル (b) は、pdi1 : His3 遺伝子に対して異型接合体の His⁺ AS32 24株の四分子 (tetrad) 分析の結果を示す。

第4図はプラスミド pUC18 の構造を示している。

第5図はプラスミド pUC-ySP-hPDI の構造を示している。

第6図は、pUC18-GAL10p (B) ADHI1

目は、酵母分泌系の限定された能力、及び該能力と高等真核生物のそれとの相違(例えばグリコシル化における相違)によって、ある程度の妥協を強いられる。

本発明は、酵母タンパク質ジスルフィドイソメラーゼを過剰発現する組換え宿主細胞内でジスルフィド結合タンパク質を産生するための新規の方法と、タンパク質ジスルフィドイソメラーゼを過剰発現する組換え酵母細胞とを提供する。本発明は、ジスルフィド結合をもつ組換え分泌タンパク質の分泌を実質的に五つ子レベルに増加させる組換え酵母宿主細胞を提供する。

発明の概要

ヒト及び酵母タンパク質ジスルフィドイソメラーゼ (PDI) をコードする DNA を単離し、プロセーターと転写ターミネーターとを含む発現カセット又はベクターにクローニングする。PDI をコードする DNA を含む発現カセット又はベクターを宿主細胞的にトランスファーすると、該細胞は PDI タンパク質を過剰産生する。これらの PDI 過剰産生細胞を、ジスルフィド結合をもつタンパク質の発現のための組換え宿主として使用する。ジスルフィド結合をもつタンパク質の分泌は、PDI 過剰産生宿主細胞では、

としても知られているプラスミド p401 の構造を示している。

第7図はプラスミド pUC18-GAL10p-yPDI-ADHI1 の構造を示している。

第8図は、X991としても知られているプラスミド pKH4₂/ATS の構造を示している。

第9図は YEP24-GAL10p-yPDI の構造を示している。

第10図は YEP24-GAL1p-MPa-hPDI の構造を示している。

第11図は pUC-GAL1/10-hPDI/ATS の構造を示している。

第12図は pUC-GAL1/10-yPDI/ATS の構造を示している。

発明の詳細な説明

酵母におけるタンパク質の折り畳み及び分泌のプロセスは極めて複雑であり、遺伝子研究に基づいて言えば、30以上の遺伝子産物が関与している (Fraenkel, A. ら, 1991, Methods Enzymology, 194, pp. 662-674)。これらの産物とし

では、ペプチジルプロリルシスートランスイソメラーゼ、PDI及び他のチオレドキシシン様タンパク質、BiP、種々の分子シャペロン (molecular chaperone) (hsp70, hsp60等)、シグナルペプチダーゼ、シグナル認識タンパク質、E. R. への崩壊体のトランスロケーションに関与する種々のタンパク質、E. R. の種々の構造及び機能成分、ゴルジ (Golgi)、並びにまだ特徴が解明されていない分泌小胞及び多くのタンパク質が挙げられる (Franzoso *et al.*, A. M., 1991, 前出引用文献; Rothman, J. E. 及び Orci *et al.*, 1992, *Nature*, 355, pp. 409-415; Gething, M. G. 及び Sambrook, G., 1992, *Nature*, 355, pp. 33-45)。このような複雑さに見えて、単一の成分 (即ちPDI) の量が増加するだけで特定の異種タンパク質の分泌が実質的に増加するという可能性は、当業者には極めて想到しにくいことと思われる。そこで本発明は、PDIの量が増加しただけで、例えばアンチヌタシンのような分泌タンパク質の量が有意に且つ実質的に増加するという極めて意外な結果を提示した。これは、タンパク質の折り畳

みに、本発明では別の実施例も、例えば非限定的具体例として哺乳動物細胞、植物細胞、細菌のような原核生物の細胞、昆虫細胞、並びに酵母及び糸状菌類のような高等真核生物の細胞と使用し得る。また、これも当業者には明らかのように、酵母及びヒト細胞以外の細胞に由来するPDIコードイングDNAの使用も本発明の範囲内に包含される。PDIコードイングDNAの別の種類の非限定的具体例としては、ヒト以外の哺乳動物、例えばラット及びマウス、非哺乳動物、例えば昆虫、並びに下等真核生物、例えば藻類が挙げられる。

Rothblatt及びMeyerの方法 (1986, *Cell*, 44, pp. 619-28) の方法で 3. cerevisiae から調製したミクロソーム膜フラクションは高レベルのタンパク質ジスルフィドイソメラーゼ (PDI) 活性を有していたが、該レベルは若狭処理によって8〜20倍増加した。これは、脊椎動物の同じ細胞コンパートメントに存在するPDI (Mills *et al.*, 1983, *Biochem. J.*, 213, pp. 245-8); Lambert及びFreeman, 1985, *Biochem. J.*, 228, pp. 635-45) 及びコムギ

の及び/又はジスルフィド結合形成の促進に関連していると思われる現象である。

本発明は、タンパク質ジスルフィドイソメラーゼ (PDI) をコードするDNAを過剰発現させることにより、置換え宿主細胞による置換えタンパク質の産生を増加させる方法を提唱する。本明細書中のPDIは、分子内及び分子間ジスルフィド結合の形成を特異的に触媒する酵素を意味する。

幾つかの種に由来するPDI遺伝子のDNA配列は当業者で知られている。これらの種の非限定的具体例としては、ヒト、ウシ、ラット、ニワトリ及び酵母が挙げられる。

(Mizunaga, 1990, *J. Biochem.*, 108, pp. 846-851; Scherrens *et al.*, 1991, *Yeast*, 7, pp. 185-193)。

PDIをコードするDNAの単離における出発材料は任意の種類の細胞又は組織であってよく、非限定的具体例としては、哺乳動物及び他の脊椎動物の細胞及び組織、並びに下等真核生物の細胞及び組織が挙げられる。ここでは本発明を、置換え酵母宿主細胞内で発現される酵母及びヒトPDIを用いて説明する。当業者には容易に理解されるよ

の同じ細胞コンパートメントに存在するPDI (Rodon *et al.*, 1982, *FEBS Lett.*, 138, pp. 121-4) と類似の酵素が、誤翻訳の小胞体の内腔に存在することを示唆するものであった。高等真核生物酵素に対して構造的、PDIをコードする遺伝子をクローニングした。高度の保存を示す可能性が最も高い領域は、骨格筋筋PDIにおいて高濃度に保存されており、特に二つの機能性ジチオール活性部位の領域でチオレドキシシンに対して極めて強い相同を示すα及びα'ドメインであると思われる。活性部位の共通配列はFYA²WCGHCK (配列番号: 4) である (Parkkonen *et al.*, 1983, 前出引用文献)。非還元性30マーオリゴヌクレオチドを酵母コードンバイアス (bias) に基づいて設計し (Sheppard, 1986, *Nucleic Acids Res.*, 14, pp. 5125-43)、これを用いて調製したマルチコピーYEpプラスミドpMA3a内で構築した酵母ゲノムライブラリーのスクリーニングに使用した (Crouzet及びTuite, 1987, *Mol. Gen. Genet.*, 210, pp. 581-2)。スクリーンから二つの極めて稀性のクローン (C7及びC10と呼ぶ) が同

約200ヌクレオチドを考慮に入れて、読取り枠により予測された通りであった。

予測されたアミノ酸配列は、下記の理由によって鉄配列が正にPDIであることを強く示唆した：

(i) 予測された59kDaの分子量と、哺乳動物PDIに特徴的なPI(4, i)とを有していた；

(ii) 該アミノ酸配列は、BBSAPFITソフトウェア(GWGCQ, University of Wisconsin)によって決定されたように、先に報告された哺乳動物及び魚類のPDI配列に対して、90～92%の全体的同一性と、58～56%の全体的類似性を示した；

(iii) 該アミノ酸配列中の位置58～66及び403～431に「ナオレドキシシド」活性部位の二つのコピーを含んでいた。また、これらの配列は、哺乳動物PDI内の重複a/a'領域に対して高度のアミノ酸同一性を示す約100アミノ酸のより大きい内部重複(internal duplication)の一部であった(第2図)。酵母及び哺乳動物PDI配列を並べると(alignment)、a及びa'領域の外側に、大きな相同を示す別の領域が存在することも明らかになった(第2図)。

G. F. ら、19814, Nucleic Acids Res., 12, pp. 1049-1068)を有する1.8kbのEamHIフラグメントがPDI1コーディング配列内のSecRV部位に挿入されている(第3図)ヌル(null)対立遺伝子を構築した。his3二倍体酵母S. cerevisiae株(AS3324: [Spalding, A., 1988, Ph. D. Thesis, University of Kent])を、pdi1::HIS3破壊を有するDNAフラグメントで形質転換して、PDI1遺伝子の二つの天然体コピーのうちの一つを機能非機能対立遺伝子で置換した。三つのHIS⁺AS3324形質転換体(Y1、Y2及びY3)を更に調べた。いずれの場合も、二倍体の孢子形成は断分子当たり二つの生存可能孢子を生産しただけであり(第3図)、これらは総てhis⁺であった。この結果は、致死型変異がpdi1::HIS3突然変異に関連していたことを示すものである。正確な遺伝子置換がHIS⁺形質転換体Y1及びY2において生じたことは、800bpのHindIII-SacIフラグメントをプローブとして用いる、PstIで消化したブロットされた酵母ゲノムDNAへのサザンハ

また、コードされたポリペプチドの別の二つの特徴は、これがS. cerevisiae小胞体の成分であることを示唆している。該タンパク質は、細胞上の分泌シグナルの特徴を有する著しく疎水性のN-末端配列をコードし(Gierasch, 1989, Biochemistry, 28, pp. 923-930)、四つのC末端アミノ酸は酵母BIPのそれと同じであり(Normingtonら、1989, Cell, 57, pp. 1223-26)、S. cerevisiaeの小胞体保持シグナルであると報告されている(Pelhamら、1988, EMBD J., 7, pp. 1757-62)。

本発明者らは、クローン化S. cerevisiae PDI遺伝子をPDI1と命名した。このS. cerevisiae PDI1遺伝子はゲノム内のただ一つのコピーに存在する。これは、筋造の0.8kb HindIII-SacIフラグメントを種々のゲノム消化物に対するプローブとして用いる高電圧ハイブリダイゼーションにより確認された。

単一のPDI1遺伝子が生存能力によって必須であるかどうかを調べるために、HIS3遺伝子[Montiel,

ハイブリダイゼーションにより確認された。PDI1遺伝子は内部PstI部位を含まないが(第3図)、HIS3遺伝子は単一PstI部位を含むため(第3図)、これで2diti::HIS3対立遺伝子は厳密に同変される筈である。予測されたように、非形質転換体AS3324では単一の9kb PstIフラグメントが検出されたが、Y1及びY2形質転換体では9kb及び2.2kbという二つのバンドが、由来の異なる二つのバンドからなると推測される9kbバンドと共に検出された。これらのデータは、二つの染色体のうち一方の染色体上のPDI1遺伝子がHIS3対立遺伝子で置換され、このような事象がハプロ致死であることを立証するものである。

酵母PDIをコードするDNAを分子的にクローニングするためには、種々の方法のうち任意のものを適用し得る。これらの方法の非限定的具体例としては、適当な発現ベクター系内でのPDI含有DNAライブラリーの構築に次ぐ、PDI遺伝子の直接的機能発現が挙げられる。別の方法は、バクテリオファージ又はプラスミドシールドベクター内で構築したPDI含有DNAライブラリーを、PDIタンパク質のアミノ酸配列から設計した標的抗体オリゴヌクレオ

ゲドプロームでスクリーニングすることからなる。好ましい方法は、プラスミドショットルベクター内で構築したヒト又は酵母PDI含有ゲノムDNAライブラリーを、酵素活性部位の既知のアミノ酸配列をコードする検定DNAプロームでスクリーニングすることからなる。

当業者には容易に理解されるように、別のタイプのライブラリー、及び別の細胞又は細胞タイプから構築したライブラリーもPDIをコードするDNAの単離に使用であり得る。別のタイプのライブラリーの非限定的具体例としては、酵母細胞以外の別のヒト、脊椎動物及び下等無脊椎動物細胞又は細胞系に由来するcDNA及びゲノムDNAライブラリーが挙げられる。

当業者には明らかなように、適切なライブラリーは、PDI活性を有する細胞又は細胞系から調製し得る。PDI-cDNAを単離するためのcDNAライブラリーの形成で使用するための細胞又は細胞系の選択は、前述の方法を用いて、最初に細胞結合PDI活性を測定することにより実施し得る。

cDNAライブラリーの形成は当業者によく知られている標準的方法で実施できる。良く知られているcDNAラ

イブラリーを形成するためのcDNAライブラリーの形成で使用するための細胞又は細胞系の選択は、前述の方法を用いて、最初に細胞結合PDI活性を測定することにより実施し得る。

本明細書では、発現ベクターは、遺伝子のクローニングコピーの転写と、mRNAの適切な宿主内での翻訳とに必要なDNA配列であると定義される。この種のベクターは、細菌、真菌、植物細胞、動物、昆虫細胞及び動物細胞のような種々の宿主内で真核生物遺伝子を発現させるのに使用し得る。

特異的に設計したベクターは、例えば、細菌-酵母又は細菌-動物細胞間のDNAのシャトリングを可能にする。通常に構築した発現ベクターは、宿主細胞内の自律的複製のための複製起点と、選択可能なマーカーと、固定数の有用な制限酵素部位と、高コピー数へのポテンシャルと、強いプロモーターとを含んでいる必要がある。プロモーターは、RNAポリメラーゼをDNAに結合させRNA合成を開始させるDNA配列であると定義される。強力なプロモーターは、mRNAが高濃度でイニシエートされる

ライブラリー構築方法は、例えばManiatis, T., Fritsch, E. F., Sambrook, J., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 1982)に記載されている。

PDIをコードするDNAを適切なゲノムDNAライブラリーから単離し得ることも当業者には明らかであろう。

ゲノムDNAライブラリーの構築は当業者によく知られている標準的方法で実施できる。良く知られているゲノムDNAライブラリー構築方法は、Maniatis, T., Fritsch, E. F., Sambrook, J., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 1982)に記載されている。

前述の方法で得たクローニングPDIは、組換えPDIを産生するために、適当なプロモーターと別の適当な転写調

ようにするプロモーターである。発現ベクターの非限定的具体例としては、クローニングベクター、座標されたクローニングベクター、特異的に設計されたプラスミド又はウイルスが挙げられる。

哺乳動物細胞内で組換えPDIを発現させるためには、種々の哺乳動物発現ベクターを使用し得る。組換えPDI発現に適し得る市販の哺乳動物発現ベクターの非限定的具体例としては、pMC1neo (Stratagene)、pXT1 (Stratagene)、pSG6 (Stratagene)、EBO-pSV2-neo (ATCC 37583)、pSPV-1 (8-2) (ATCC 37110)、pdBPV-MMTneo (342-12) (ATCC 37224)、pRSVgpt (ATCC 37199)、pRSVneo (ATCC 37198)、pSV2-dhfr (ATCC 37146)、pUC7sg (ATCC 37460) 及びgZD35 (ATCC 37565) が挙げられる。

PDIをコードするDNAはまた、種々の組換え宿主細胞内での発現のために発現ベクターにクローニングし得る。組換え宿主細胞は原核生物、例えば非限定的具体例として

細胞、又は真核生物、例えば非限定的具体例として酵母、哺乳動物細胞、例えば非限定的具体例としてヒト、マシ、ブタ、サル及び霊長類動物に由来する細胞系、並びに胚性細胞、例えば非限定的具体例として Embryonal 由来細胞系、及び組換えバクテリオウイルス発現系と共に使用される Subcloning in prokaryotes

(SFG) 昆虫細胞であってよい。適切なものとして使用し得る市販の哺乳動物細胞系は非限定的具体例としては、Cv-1 (ATCC CCL 70)、COS-1 (ATCC CRL 1650)、COS-7 (ATCC CRL 1651)、CHO-K1 (ATCC CCL 61)、3T3 (ATCC CCL 92)、NIH/3T3 (ATCC CRL 1658)、HeLa (ATCC CCL 2)、C127 (ATCC CRL 1616)、BS-C-1 (ATCC CCL 26) 及び MRC-5 (ATCC CCL 171) が挙げられる。

酵母活性プロモーターは酵母宿主内でのPDI遺伝子の転写を開始させる。従って、当業者には容易に理解されるように、任意の酵母活性プロモーター配列、例えば非限定的具体例として、GAL1、GAL10、GAL7、PG

的にクローニング配列決定した。それぞれのコーディング領域の5'側の調節及びプロモーター配列は、lacZ 遺伝子のコーディング領域に隣接して配置した。これらの実験で、ガラクトースの誘導に必要十分なプロモーター及び調節配列が決定された。

S. cerevisiae はまた、各々がADHのアイソザイムをコードする三つの遺伝子を有する。これらの酵素のうちの一つであるADH1は、S. cerevisiae が酸化的増殖時にエタノールを炭素源として利用する能力に関与している。ADH1 [アイソザイムをコードするADH2遺伝子の発現はグルコースにより異化代謝物抑制されるため、0.1% (w/v) のレベルのグルコースの存在下では発酵的増殖時のADH2遺伝子の転写は実質的に行われない。グルコースが欠失しており且つ非抑制炭素源が存在すると、ADH2遺伝子の転写は1000~10000倍誘導される。この遺伝子を分子的にクローニングして配列決定し、転写の抑制解除 (derepression) に必要十分な調節及びプロモーター配列を決定した。

アルファ接合因子 (α mating factor

K1、ADH1、ADH2、PHO5 及び GAP491

(TDH3) を利用し得る。また、組換え宿主内でのPDIの発現をアッセイするために、適当なアッセイシステム、例えばイムノブロット又はRIAもしくはエンザイムイムノアッセイ (EIA) を使用し得ることも当業者には明らかであろう。

S. cerevisiae は、増殖用炭素源としてのガラクトースの代謝に関与している酵素をコードする遺伝子を三つ有している。GAL1、GAL2、GAL5、GAL7 及び GAL10 はそれぞれ、ガラクトキナーゼ、ガラクトースペルメラーゼ、カステグルコムターゼの誘発アイソザイム、 α -D-ガラクトース-1-ホスフェートウリジルトランスフェラーゼ及びウリジンシホスホガラクトース-4-エピメラーゼをコードする。ガラクトースが存在しないと、これらの酵素の発現はほとんど検出されない。細胞をグルコースで増殖し、次いでガラクトースを培養物に加えると、これらの酵素の発現はRNA転写のレベルで、少なくとも1、000倍だけ (GAL5 は例外であって、約5倍に誘導される) 誘発的に誘導される。GAL1、GAL2、GAL5、GAL7 及び GAL10 遺伝子を分子

的にクローニング配列決定した。それぞれのコーディング領域の5'側の調節及びプロモーター配列は、lacZ 遺伝子のコーディング領域に隣接して配置した。これらの実験で、ガラクトースの誘導に必要十分なプロモーター及び調節配列が決定された。

S. cerevisiae はまた、各々がADHのアイソザイムをコードする三つの遺伝子を有する。これらの酵素のうちの一つであるADH1は、S. cerevisiae が酸化的増殖時にエタノールを炭素源として利用する能力に関与している。ADH1 [アイソザイムをコードするADH2遺伝子の発現はグルコースにより異化代謝物抑制されるため、0.1% (w/v) のレベルのグルコースの存在下では発酵的増殖時のADH2遺伝子の転写は実質的に行われない。グルコースが欠失しており且つ非抑制炭素源が存在すると、ADH2遺伝子の転写は1000~10000倍誘導される。この遺伝子を分子的にクローニングして配列決定し、転写の抑制解除 (derepression) に必要十分な調節及びプロモーター配列を決定した。

アルファ接合因子 (α mating factor) は、MAT α 細胞と MAT α 細胞との間の接合に必要とされる S. cerevisiae の性フェロモンである。このトリデカペプチドは、組蛋白相体内に送られ、グリコシル化され、タンパク質分解的にプロセッシングされて、細胞から分泌される最終成熟形態となるプレプロフェロモンとして発現される。この生化学的経路は、外来ポリペプチドの発現ストラテジーとして利用されてきた。アルファ接合因子遺伝子は分子的にクローニングされ、プレプロリグー配列を有する該遺伝子のプロモーターは種々のポリペプチドの発現及び分泌に利用されてきた。また、PHO5 遺伝子プロモーターは低濃度ホスフェートによって誘導し得ることが判明した。これは、酵母内での外来タンパク質の生理学的に調節された発現によっても有用である。

アルファ接合因子プロモーターは、表現型的に点である細胞内でのみ活性を示す。S. cerevisiae には 5IR として知られている四つの遺伝子座があり、これらは a 及び + 情報の通常サイレントの別のコピーの抑制に必要なタンパク質を合成する。この抑制事象を妨害する温度感受性 (ts) 誘育が、これらの遺伝子座のうち少なくとも一つの座の遺伝子座物内に存在する。この突然変異株で

は、35℃までの増殖が抑制を阻止し、その結果、アルファ融合因子プロモーターが不活性である表現型的にa/aの細胞が生じる。温度を20℃にシフトすると、細胞は従来型的にaに戻り、その結果プロモーターが活性化になる。10

④ SIR 障害を有する株の使用は、幾つかの外來ポリペプチドの制御された発現について説明されてきた。

当業者には容易に理解されるように、PDI の発現のための適当な酵母株は広範囲の候補の中から選択される。適当な酵母株の非限定的具体例としては、プロテアーゼ又は及び酸化したグリコシル化能力といったような遺伝子型的及び表現型的特徴を有するものが挙げられる。

Saccharomyces 属は様々な種からなる。S. cerevisiae は種々の外來ポリペプチドの組換え DNA 仲介発現のための宿主として最も一般的に使用されている。しかしながら、Saccharomyces 属の他の種の間の区別は必ずしも明確ではない。これらの種の多くは S. cerevisiae と交雑することができ、S. cerevisiae のプロモーターと類似の又は同じプロモーターを有していると思われる。従って、当業者には容易に理解されるように、PDI 発現のための宿主株

は、当業者には容易に理解されるように、PDI 発現のための宿主の選択範囲は、Saccharomyces 科及び Ascomycota 科の別の酵母属の種、例えば非限定的具体例として Candida、Hansenula、Kluyveromyces、Pichia、Saccharomycesopsis 及び Tetrahymena にまで広がる。

発現ベクターは、多くの方法、例えば非限定的具体例として形質転換、トランスフェクション、プロトプラスト融合及び電気穿孔法のうち任意の方法を用いて宿主細胞内に導入し得る。発現ベクター含有細胞はクローン的に増殖し、種々に分析して、PDI タンパク質を産生するかどうかを調べる。PDI 発現宿主細胞クローンの同定は、幾つかの方法、例えば非限定的具体例として抗 PDI 抗体に対する免疫学的反応性、及び宿主細胞結合 PDI 活性の存在によって実施し得る。

PDI DNA の発現はまた、in vitro で産生した合成的 DNA を用いて実施し得る。合成的 DNA は種々の無細胞システム、例えば非限定的具体例としてコムギ胚芽抽出物及び鶏胚血球抽出物中で効率的に翻訳できる

の選択範囲は、Saccharomyces 属の別の種、例えば非限定的具体例として carlsbergensis、diastaticus、elongisporus、kluyveri、montanus、robensis、oviformis、rouxii 及び uvarum にまで広がる。

幾つかの酵母属、例えば Candida、Hansenula、Pichia 及び Tetrahymena は、唯一の増殖用炭素源としてのメタノールの利用について類似の代謝経路を有することが判明した。この代謝経路に関与する酵素であるアルコールオキシゲナーゼの遺伝子は Pichia pastoris から単離されている。P. pastoris アルコールオキシゲナーゼプロモーターは単離されて、発現のメタノール誘導に敏感であることが判明した。このような誘導可能プロモーターは、酵母内でのポリペプチド発現に有用である。特に、このプロモーターは、P. pastoris 内での異種遺伝子の誘導可能な発現用のプラミド上で結合であることが判明した。この観察は、別の酵母属が従来型のポリペプチドの組換え DNA 仲介発現のための宿主として機能する可能性を強調するものである。

と共に、細胞ベースのシステム、例えば非限定的具体例としてカエル卵母細胞内へのマイクロインジェクションで効率的に翻訳できる。

当業者には容易に理解されるように、PDI は、細胞当たり単一のコピー又は複数のコピーで、宿主細胞ゲノムに組込まれた組換え発現カセットに由来する組換え宿主内で発現され得る。また、これも当業者には明らかであろうが、PDI は、細胞当たり単一のコピー又は複数のコピーで自律的複製プラスミド上に存在する組換え発現カセットに由来する組換え宿主内で発現され得る。

組換え PDI を発現する組換え宿主細胞は、別の組換え遺伝子の発現のための宿主として使用し得る。本発明の新規の方法は、組換え PDI を発現する宿主細胞内で、ジスルフィド結合をもつ組換えタンパク質をコードする DNA を発現させることにより、ジスルフィド結合をもつ組換えタンパク質の収率を実質的に増加させる。当業者には容易に理解されるように、本発明の方法ではジスルフィド結合をもつ種々のタンパク質が産生され得る。ジスルフィド結合をもつタンパク質の非限定的具体例としては、分泌されるか又は細胞結合状態を保持するタンパク質が挙げられる。

ジスルフィド結合をもつ組換えタンパク質の発現のための組換えDNA構築物は、PDIについて詳述した方法によって形成し得る。当業者には明らかなように、ジスルフィド結合をもつ組換えタンパク質をコードするDNAは、細胞当たり単一のコピー又は複数のコピーで、宿主細胞ゲノムに組み込まれた組換え発現カセットから発現され得る。また、これも当業者には明らかなであろうが、ジスルフィド結合をもつ組換えタンパク質をコードするDNAは、細胞当たり単一のコピー又は複数のコピーで、自律的複製プラスミド上に存在する組換え発現カセットから発現され得る。更に、これも当業者には容易に理解されることであるが、PDIをコードするDNA及びジスルフィド結合をもつ組換えタンパク質をコードするDNAは、細胞当たり単一のコピー又は複数のコピーで、同一プラスミド上に存在し得る。ジスルフィド結合をもつ二つ以上のタンパク質が、組込まれたカセットもしくはプラスミド上のカセット、又はこれらの組み合わせから同時発現され得ることも当業者には明らかなであろう。

組換え宿主細胞内でのPDIの発現後は、PDIタンパク質を回収して、タンパク質中のジスルフィド結合の形成

ass binding) という用語は、抗体種が特定の抗原又はエピトープ、例えば前述のようなPDIと結合する能力を得ず。腫瘍特異的抗体は、マウス、ラット、モルモット、ウナギ、ヤギ、ウマ等の動物、好ましくはウサギを、免疫アジュバントを用いて又は用いないで、適当な濃度のPDIで免疫感作することにより産生する。

最初の免疫感作の前には免疫前血清を回収する。貯蔵し得る免疫アジュバントと組合わせたPDIを約0.1mg〜1000mgで各動物に投与する。貯蔵し得る免疫アジュバントの非限定例としては、フロインドの完全アジュバント、フロインドの不完全アジュバント、ミョウバン塩化物、Corynebacterium parvum及びiRNAを含む油中水エマルジョンが挙げられる。最初の免疫感作は、好ましくはフロインドの完全アジュバント中の酵素を、皮下(SC)、腹腔内(IP)又はその両方で複数の部位に注射することからなる。各動物から一定の時間間隔、好ましくは一週間間隔で採血して、抗体力価を測定する。動物には、最初の免疫感作後は、ブースター注射をしてもしなくてもよい。ブースター注射をした動物には、通常、同量のフロインド完全アジュバント中酵素を同

を接種することが出来る活世型の精製PDIを取得し得る。PDI精製方法は種々存在し、使用に悉している。突然変異に由来するPDIの精製について明述したように、組換えPDIは細胞溶解物及び抽出物、又はならし培養培養液から、塩析法、イオン交換クロマトグラフィー、サイズ排除クロマトグラフィー、ヒドロキシルアパタイト吸着クロマトグラフィー及び疎水的相互作用クロマトグラフィーを種々に組合わせて又は種々に適用して精製し得る。

更に、組換えPDIは、PDIに特異的なモノクローナル又はポリクローナル抗体を用いて形成したイムノアフィニティカラムを用いて、別の細胞タンパク質から分離することができる。

PDIに対する単一特異性抗体を、PDIに対して反応性を示す抗体を含む哺乳動物抗血清から精製するか、又はKohler et al及びMilstien et al, Nature 256: 495-497 (1975)に記載の方法を用いて、PDIに対して反応性を示すモノクローナル抗体として製造する。本明細書中の単一特異性抗体は、PDIに対する均一結合特性を有する単一の抗体種又は複数の抗体種であると定義される。本明細書中の均一結合(homogeneous

一注射で与える。ブースター注射は、最大力価が得られるまで約2週間の間隔で行う。各ブースター感作から約2週間、又は単一免疫感作の後で約1週間毎に動物から採血し、血清を回収し、アリコートを約-20℃で貯蔵する。

近交系マウス、好ましくはBALB/cをPDIで免疫感作して、PDIと反応するモノクローナル抗体(mAb)を製造する。マウスは、前述のように、IP又はSC経路で、同量の貯蔵し得るアジュバントに混入した約0.5mgの濃希液又は生理食塩水中約0.1mg〜約10mg、好ましくは約1mgのPDIで免疫感作する。好ましくはフロインドの完全アジュバントを使用する。マウスは0日目と最初の免疫感作を施し、約3〜約30週間にわたって休息させる。免疫感作したマウスには、リン酸緩衝液型食塩水のような緩衝液溶液中約0.1〜約10mgのPDIの投与からなる一回以上のブースター免疫感作を、静脈注射(IV)によって施す。抗体陽性マウスに由来するリンパ球、好ましくは脾臓リンパ球を、当業者に公知の標準的方法で免疫マウスから脾臓を除去することによって得る。脾臓リンパ球と適当な融合相手、好ましくは骨髓腫細胞とを、安定なハイブリドーマを形成させる条件下で混合して、

ハイブリドーマ細胞を製造する。融合相手の非限定的具体例としては、マウス骨髄腫 P 3 / NS 1 / A 5 4 - 1 ; M P C - 1 1 ; S - 1 9 4 及び S p 2 / 0 が挙げられるが、好ましいのは S p 2 / 0 である。抗体産生細胞及び骨髓腫細胞を、約 3 0 % ~ 約 5 0 % の濃度で、約 1 0 0 0 m o l / m l のポリエチレングリコール中で融合させる。融合者は公知の方法で、ヒポキサンチン、チミジン及びアミノプテリンを添加したダルベッコ改質イーグル培養 (D M E M) での増殖により、融合したハイブリドーマ細胞を選別する。約 3 4、3 8 及び 4 2 日に海綿陽性ウェルから上清液を回収し、P D I を抗原として用いる固相イムノラジオアッセイ (S P I R A) のようなイムノアッセイによってスクリーニングし、抗体の産生を調べる。m A b のアイソタイプを調べるために、培養液を O u e h l e r J o n y 沈降アッセイでも検査する。抗体陽性ウェルからのハイブリドーマ細胞を、M a c P h e e s o n の軟質凝死技術 (S o f t A g a r T e c h n i q u e s, T i s s u e C u l t u r e M e t h o d s a n d A p p l i c a t i o n s, K r u s e 及び P a t e r s o n 編、A c a d e m i c P r e s s, 1 9 7 3) によりクローニン

製造するための前述の方法は、P D I ポリペプチドフラグメント又は完全長もの P D I ポリペプチドに特異的な抗体の産生に使用し得る。

抗体がアガロースゲルビーズ支持体との共有結合を形成するように N - ヒドロキシスクレンイミドエステルで予備活性化したゲル支持体である A f f i g e i - 1 0 (B i o r a d) に抗体を加えて、P D I 抗体アフィニティカラムを形成する。抗体は、スパーカーアームとのアミド結合を介してゲルに結合する。次いで、残りの活性化エステルを 1 M エタノールアミン H C l (p H 8) でクエンチする。カラムを水及び 0. 2 3 M グリシン H C l (p H 2. 6) で順次洗浄して、非結合抗体又は外来タンパク質を除去する。次いでカラムをリン酸塩緩衝生理食塩水 (p H 7. 3) 中で平衡化し、P D I を含む細胞培養上清又は細胞抽出物をゆっくりとカラムに通す。該カラムをリン酸塩緩衝生理食塩水で光学密度 (A₂₈₀) がバックグラウンドに低下するまで洗浄し、次いでタンパク質を 0. 2 3 M グリシン - H C l (p H 2. 6) で溶離する。次いで、精製 P D I タンパク質をリン酸塩緩衝生理食塩水に対して透析する。

グする。

初回抗原刺激 (p r i m i n g) から約 4 日後、ブリスケン感染 B e i b / e マウスに、マウス当たり約 0. 5 m l で、約 2 × 1 0⁶ ~ 約 6 × 1 0⁶ のハイブリドーマ細胞を注射することにより、モノクローナル抗体を i n v i v o で発生する。細胞のトランスファーから約 8 ~ 1 2 日後に腹水を回収し、当業者に公知の方法でモノクローナル抗体を精製する。

約 2 % のウシ胎児血清を含む D M E M 中でハイブリドーマを増殖させて i n v i t r o の m A b 産生を行い、十分な量の特異的 m A b を得る。該 m A b を当業者に公知の方法で精製する。

腹水又はハイブリドーマ培養液の抗体組成、種々の血清学的又は免疫学的アッセイ、例えば非限定的具体例として、沈降法、受動凝集、E l i s a (e n z y m e - l i n k e d - i m m u n o s o r b e n t - a n t i b o d y) 及びラジオイムノアッセイ (R I A) で測定する。類似のアッセイを用いて、体液又は組織及び細胞抽出物中の P D I の存在を検出する。

当業者には容易に理解されるように、単一特異性抗体を

以下の実施例は本発明を説明するためのものであって、その範囲を限定するものではない。

実施例 1

株及び増殖条件

S a c c h a r o m y c e s c e r e v i s i a e 株 M D 4 0 / 4 C (M A T a、1 e u 2 - 3 - 1 1 2、u r a 2、h i s 3 - 1 1、- 1 6、t r p 1) 及び A S 8 3 2 4 (M A T a / M A T " a" h i s 3 / h i s 3、1 e u 2 / 1 e u 2、u r a 3 / u r a 3、t r p 1 / t r p 1) を、Y E P D (1 % バクトペプトン、1 % 酵母抽出物、2 % グルコース) 又は p H 6. 8 緩衝最少培地 (0. 6 7 % アミノ酸無含有酵母營養ベース、2 % グルコース、1 % コハク酸、0. 6 % N a O H、5 0 μ g / m l ノゾイノシトール) に必要な塩素及びアミノ酸を加えたもので 3 0 °C で増殖させた。

S. c e r e v i s i a e 株 J R Y 1 2 8 (M A T a、s i r 3 - 8、1 e u 2 - 1 1 2、t r p 1、u r a 3 - 3 2、h i s 4; B r a k e, A. J. 6, 1 9 8 4, P r o c. N a t' l. A c a d. S c i. U S A, 8 1、

pp. 4842-4846) 及びBJ1995 (MATa, issu2, trp1, ura3-52, prb1-132, pep4-3, kai2; Jones, E. W., 1991, Methods Enzymol., 194, pp. 428-453) をPDI過剰発現の経路に使用し、適当な実施例に記載のように増殖させた。

大腸菌 (*Escherichia coli*) 株DH5α (supE44ΔlacU169 (φ80_{lacZ}ΔM15) hsdR17 recA1 serdA2 galP 96 thi-1 relA1) をプラスミドスクリーニング操作に使用した。

実施例 2

DNA操作

制限ヌクレアーゼ消化及びDNA連結を、酵素製造業者 (BCL, BRL) の指示に従って実施した。E. coli 上形質転換の標準的プロトコル (Cohenら, 1972, P. N. A. S. U.S.A., 69, pp. 2110-9) 及び S. cerevisiae 形質転換の標準的プロトコル (Beggs, 1978, Nature, 275, pp.

6, 前出引用文献) を従った。

非増込みヌクレオチドから標識オリゴヌクレオチドを分離すべくDE-52クロマトグラフィーを使用して、前記ライブラリーをスクリーニングするために、前記オリゴヌクレオチド50ngを[γ-³²P] dATP [Amersham, 3000Ci/mmole] 及びT4ポリヌクレオチドキナーゼで末端標識した。次のようなコロニーハイブリダイゼーションにより、約20, 000 DH5α超換えコロニーをニトロセルロースフィルターでスクリーニングした: 各ニトロセルロースフィルターを、55%ホルムアミド、6×SSC、1×ダンハート溶液、250μg/ml変性サケ精子DNA、0.1%SDS中で、37℃で16時間におたり予備ハイブリダイズした。標識オリゴヌクレオチド (比活性4, 8×10⁷dpm/μg) を90℃で3分間実性し、次いで予備ハイブリダイゼーション緩衝液中で2ng/mlに希釈し、フィルターに加えた。37℃で更に16時間インキュベートした後、フィルターを除去し、4×SSC、0.1%SDS中で2分間洗った。該フィルターを一晩オートラジオグラフィにかけた。

39個の潜在的陽性コロニーが同定され、これらを同定

104-9:1106, 1983, J. Bacteriol., 153, pp. 163-8) を実施した。Holmらの方法 (1983, Gene, 42, pp. 168-73) で S. cerevisiae からゲノムDNAを製造した。

実施例 3

PDI遺伝子の単離

高コピー数 LEU2-d、2ミクロンベクターpMA3a (Crouzet及びTuite, 1987, 前出引用文献) の BamHI 部位にクローニングした S. cerevisiae 株SKQ2α [α/sade1/+ade2/ahis1/+; Gationら, 前出引用文献] に由来するDNAの部分 Sau3Aフラグメントを含む酵母ゲノムライブラリーを、PDI遺伝子についてのスクリーニングに使用した。30マーオリゴヌクレオチド (5'-GTACACTGACCAACACCAATGGAACGTAGAA3') (配列番号: 3) を、高濃度に保存されている「デオレドキシン機」標識部位 (FYAPWCGHCK) (配列番号: 4) に対して、低し解母コドンバイアスを用いて (Scharfら, 198

のスクリーニングに更に2回かけると、その後で10個の陽性クローン (標識付きC1~C10) が得られた。これらのクローンのうちの二つ (C7及びC10) の制限地図を作成し、クローンC7を後述の研究のために選定した。

実施例 4

DNA配列の解析

配列決定に適した大きさのフラグメントを同定するために、クローンC7を一連の制限酵素で消化し、1%アガロースゲル上でフラグメントを分離し、真空ブロッティング装置 (Hybaid Ltd.) を用いて Gene-Screen Plusメンブラン (Dophont) にトランスファーした。次いで、Maniatisらの方法 (1982, 前出引用文献) に実質的に従ってフィルターを予備ハイブリダイズし、その後、前述のように末端標識した30マーオリゴヌクレオチドプローブを加えた。ハイブリダイゼーションを6×SSC中43℃で24時間実施し、次いで2回の洗浄を200mlの2×SSC中室温で5分間行い、更に2回の洗浄を200mlの2×SSC、0.1%SDS中55℃で1時間行い、最後に500mlの0.

1×SSC中で室温で1回洗浄した。次いでフィルターを-70℃で45時間オートラジオグラフィーにかけた。

ゾデオキシ種ターミネーター法(Sangerら, 1977, Proc. Nat'l. Acad. Sci. U. S. A., 74, 5463-67)を用いて、クローンC7に由来する2.4kbのBamHI-EcoRIフラグメントを完全に配列決定した。配列決定に適した制限フラグメントを、Hojmes及びQeigleyの迅速な方法(1981, Anal. Biochem., pp. 193-7)を用いて配列決定用に製造したプラスミドDNAとpUC19とにサブクローニングした。更に、幾つかのフラグメントを一本鎖ベクターmp12又はmp13にクローニングした(Messing, 1988, Methods Enzymol., 101, pp. 20-78)。一連の配列決定プライマー(15~18マー)を合成した。これらのプライマーは、クローニングベクターのポリリンカー領域、又は予め決定した内部C7-DNA配列にアニーリングする。プライマーのアニーリングに先立ち、プラスミドDNAを0.2M NaOH、2mM EDTA中で37℃で30分間変性し、0.1容の3M酢酸ナトリウ

ムPH5, 6の溶液によって中和し、3容の95%エタノールで-70℃で15分間沈降させた。[α-³²P] dATP (3000Ci/mmol; ICN)を標識に使用して、in vitroの延伸を行うために、T7-DNAポリメラーゼ(Sequences, U.S. Biochemicals)を製造業者の指示通りに使用した。反応を既に記述されている方法で解析した(Soussiara, 1989, Gene, 78, pp. 323-30)。

実施例 5

RNAの製法及び解析

株MD40/40の指数増殖細胞(5×10⁶~1×10⁷細胞/ml)又は定常期細胞(2×10⁶細胞/ml)から完全RNAを製造した。30分間の熱衝撃(30℃~42℃)にかけたMD40/40の指数増殖細胞からもRNAを抽出した。完全RNAは、本質的にDobsonの方法(1989, Nucleic Acids Res., 11, 2287-2892)に従って抽出した。

ノーザンブロット解析を次のように実施した: 20μgの完全RNAを20%ホルムアルデヒド、50%酸イオン

実施例 6

pd11::HIS3対立遺伝子の構築

HIS3遺伝子を有する1.8kbのBamHIフラグメントをプラスミドpMA700から放出させ(Monticella, 1984, 前出引用文献)、1%塩酸点アガロース(Stigma)上で精製した。該フラグメントのBamHI末端末端を、Maniatisらの方法(1982, 前出引用文献)で、dNTPsとDNAポリメラーゼIのクレノワフラグメントとを用いて充填した。次いでPD11遺伝子の1.2kb EcoRI-BglIIフラグメントを、プラスミドpUC19のポリリンカー内のSmaI-BamHI部位にサブクローニングした。最後に、HIS3遺伝子を含む充填したBamHIフラグメントを、PD11コーディング領域内の単一のEcoRV部位に連結した(第3図)。得られたpd11::HIS3対立遺伝子を3.0kbのSalI-EcoRIフラグメント上に遊離させ、低融点アガロース上で精製し、1μlもの酢酸リチウム形態転換プロトコル(1983, 前出引用文献)を用いて二倍体株AS3324をHis⁺プロトタイプ

ホルムアミド中で55℃で15分間加熱することにより変性し、次いで8%ホルムアルデヒドを含む1%アガロースゲル中で分離した。該RNAを異相ブロッティングでニトロセルロースフィルター(S&S, BA85)にトランスファーし、該フィルターを10mM トリス-HCl中で5分間煮沸した。ハイブリダイゼーションを、10×デンハート溶液、2×SSC、50mMリン酸塩緩衝液pH6.5、40%ホルムアミド、0.1%SDS、400μg/ml熱変性サケ精子DNA及び1~5ng/mlのプロンプ中で42℃で一晩実施した。フィルターを-70℃で1~5日間オートラジオグラフィーにかけた。使用したプローブは、PD11遺伝子に由来する0.8kbのHindIII-SilIフラグメント(Parguhar, R., 前出引用文献、第2図参照)、並びにpBR322にクローニングしたS. cerevisiaeの18S及び25SリボソームRNA遺伝子の一部分を含むプラスミドScp7(Dr. B. S. Cox, University of Oxfordから入手)である。これらのプローブは、ランダムプライマー法(BCL)で製造業者の指示に従って標識した。

(property) に影響を及ぼすのに使用した。

実施例 7

in vitro の PDI アッセイ

全タンパク質抽出物における PDI 活性のアッセイを、Hill 等の方法 (1984, Methods Enzymol., 107, pp. 281-92) で実施した。

試薬の調製

スクランブルリボヌクレアーゼ (scramble ribonuclease) は、ランダムに形成されたジスルフィド結合を含む完全に酸化した混合物である。これは、市販の (Sigma) ワシ標識リボヌクレアーゼ A から下記の方法で調製する。

リボヌクレアーゼを、50 mM トリス-HCl 緩衝液、pH 8.6、8.9 M 尿素、100 mM ジチオトレイトール (還元可能ジスルフィド結合に対して約 1.5 倍モル過剰なジチオトレイトール) 中 80 mg/ml (約 2.2 mg/ml) で、室温で 18 時間〜20 時間、又は 55°C で 1 時間イン

キュベーションし、スクランブル産物を回収する。タンパク質含有フラクションをブールし、1 M トリスで pH 8 に調整し、4°C で貯蔵する。

この方法によるスクランブルリボヌクレアーゼの収率は通常 90〜100% である。該産物は溶液中 4°C で 6 ヶ月まで安定であり、あるいは、50 mM NH₄HCO₃、pH 7.8 中に透析し、次いで凍結乾燥して、-20°C で無期限に貯蔵し得る白色結晶性固体物質としてもよい。

アッセイの手順

試薬、スクランブルリボヌクレアーゼは、約 2% の天然リボヌクレアーゼ活性を有する高分子量 RNA の加水分解開裂では本質的に不活性である。スクランブルリボヌクレアーゼ中の分子間及び分子内ジスルフィドの交換の阻害における PDI の作用は、天然ジスルフィド結合、天然配座を回復させ、RNA に対するリボヌクレアーゼ活性を部分的に回復させる (concomitant refection)。このようにして、PDI の活性を、処置中にアリコートが採取されるタイムコース (time-course) インキュベーションによってアッセイし、RNA に対するリボヌクレアーゼ活性を測定する。

反応混合物を氷酢酸で pH 4 に酸性化し、その後、脱ガスし、0.1 M 酢酸で Sephadex G-25 カラムから溶離することにより、還元タンパク質を分離する。280 nm で溶離フラクションをモニターし、タンパク質含有フラクションをブールし、天然リボヌクレアーゼを標準として用いて、タンパク質濃度を分光光学的に又は化学的に測定する。

還元リボヌクレアーゼの試料を、0.1 M 酢酸で約 0.5 mg/ml に希釈する。固液相を最終濃度 10 M まで加え、塩酸サルコシンを 0.1 M まで加える (サルコシンは濃厚尿素溶液中に存在するシアネートイオンと反応させるために加えられ、カルバミル化によってリボヌクレアーゼを不活性化し得る)。1 M トリスで pH を 8.5 に調整し、等所温で 2〜3 日間インキュベートする。その間にタンパク質は大概 0.1% によってランダムに再酸化される。このインキュベーションの後で、5, 5'-ジチオビス (2-ニトロ安息香酸) を用いて遊離チオール基を調べると、再酸化が完了していることが判明する (リボヌクレアーゼ分当り 0.1 以下の遊離チオール)。

氷酢酸で pH 4 に酸性化し、0.1 M 酢酸中で Sep

hadex G-25 から溶離することにより、スクランブル産物を回収する。タンパク質含有フラクションをブールし、1 M トリスで pH 8 に調整し、4°C で貯蔵する。

この方法によるスクランブルリボヌクレアーゼの収率は通常 90〜100% である。該産物は溶液中 4°C で 6 ヶ月まで安定であり、あるいは、50 mM NH₄HCO₃、pH 7.8 中に透析し、次いで凍結乾燥して、-20°C で無期限に貯蔵し得る白色結晶性固体物質としてもよい。

アッセイの手順

試薬、スクランブルリボヌクレアーゼは、約 2% の天然リボヌクレアーゼ活性を有する高分子量 RNA の加水分解開裂では本質的に不活性である。スクランブルリボヌクレアーゼ中の分子間及び分子内ジスルフィドの交換の阻害における PDI の作用は、天然ジスルフィド結合、天然配座を回復させ、RNA に対するリボヌクレアーゼ活性を部分的に回復させる (concomitant refection)。このようにして、PDI の活性を、処置中にアリコートが採取されるタイムコース (time-course) インキュベーションによってアッセイし、RNA に対するリボヌクレアーゼ活性を測定する。

反応混合物を氷酢酸で pH 4 に酸性化し、その後、脱ガスし、0.1 M 酢酸で Sephadex G-25 カラムから溶離することにより、還元タンパク質を分離する。280 nm で溶離フラクションをモニターし、タンパク質含有フラクションをブールし、天然リボヌクレアーゼを標準として用いて、タンパク質濃度を分光光学的に又は化学的に測定する。

還元リボヌクレアーゼの試料を、0.1 M 酢酸で約 0.5 mg/ml に希釈する。固液相を最終濃度 10 M まで加え、塩酸サルコシンを 0.1 M まで加える (サルコシンは濃厚尿素溶液中に存在するシアネートイオンと反応させるために加えられ、カルバミル化によってリボヌクレアーゼを不活性化し得る)。1 M トリスで pH を 8.5 に調整し、等所温で 2〜3 日間インキュベートする。その間にタンパク質は大概 0.1% によってランダムに再酸化される。このインキュベーションの後で、5, 5'-ジチオビス (2-ニトロ安息香酸) を用いて遊離チオール基を調べると、再酸化が完了していることが判明する (リボヌクレアーゼ分当り 0.1 以下の遊離チオール)。

氷酢酸で pH 4 に酸性化し、0.1 M 酢酸中で Sep

タンパク質ジスルフィドイソメラーゼの試料を、50 mM リン酸ナトリウム緩衝液、pH 7.5 に、最終量が 900 μl になるまで加え、10⁻⁴ M ジチオトレイトール (10 μl の 1 mM ストック溶液、毎日新しく調製) と共に 30°C で 2〜8 時間予備インキュベートする。トリス-HCl 緩衝液も使用し得るが、その場合は活性が約 25% 低下する。次いでアッセイを、スクランブルリボヌクレアーゼの 100 μl アリコート (10 mM 酢酸中 0.5 mg/ml ストック溶液、毎日新しく調製) の添加により開始し、インキュベーション混合物を 30°C に維持する。より小さい規模で操作する場合は、前述の量を 1/10 に減少して、最終アッセイ量を 100 μl とし得る。10 μl アリコートを 0.5 分の時点で採取し、その後 2〜3 分間隔で 1.8 分まで採取して、スクランブルリボヌクレアーゼの再活性化についてアッセイする。各アリコートは、30°C で予め平衡化した石英キュベット内で、0.25 mg の高濃度に重合した酵母 RNA (30 μl の 5 mg/ml ストック溶液) を含む 8 ml の 7 M 尿素液 (50 mM トリス-HCl 緩衝液、pH 7.5、2.5 mM KCl、5 mM MgCl₂) のアッセイ混合物に即座に加える。Perk

incubation 356分光強度計（バンド幅2.5nm）のデュアル波長モードを用いてリボヌクレアーゼ放出を30℃でモニターし、 A_{260} （ ΔA ）に対する A_{280} の変化を測定する。RNA加水分解速度（ ΔA 分 $^{-1}$ ）は1.5～2分におたって一定である。この速度に対してインキュベーションからのアリコートの採取時間をプロットしたグラフは、15分まで直線である。時間座移（time course）の終直線部分の勾配（ ΔA 分 $^{-1}$ 分 $^{-1}$ ）を三つ組みアッセイの線形回帰分析で計算し（相関係数は決まっておき0.99である）、タンパク質ジスルフィドイソメラーゼ活性の測定値とする。

ジチオトリスイトールのみによるスクランブルリボヌクレアーゼの非酵素的再活性化の速度を測定するために、酵素試料を省略して対照インキュベーションを調製する。これらの速度は通常 $0.2 \times 10^{-1} \Delta A$ 分 $^{-1}$ 分 $^{-1}$ であり、酵素試料のタンパク質ジスルフィドイソメラーゼ活性の計算で差し引かれる。

1単位のタンパク質ジスルフィドイソメラーゼ活性は、1リボヌクレアーゼ単位/分の速度でスクランブルリボヌクレアーゼの再活性化を触媒する量であると定義される。

実施例 8

酵母LY82又はURA3座に組み込まれた複製カセットを挿入するためのベクターの構築

LY82での組込みのためのベクターを下記の手順で構築した。プラスミドpUC19をHindIIIで消化し、線形ベクターフラグメントをゲル精製した。次いでこのフラグメントをEcoRIで消化し、得られた2.7kbpのEcoRI-HindIIIベクターフラグメントをゲル精製した。該精製フラグメントを下記の合成オリゴヌクレオチドと連結した：

5'-ATTGCGCGCCGCATGGTTGCGCGCCGC-3'（配列番号：6）

3'-CGCGCGCGTTGCGATCGCGCGCGTCCA-5'（配列番号：7）

該オリゴヌクレオチドは、EcoRI付着末端と、NotI部位と、HindIII部位と、NotI部位と、HindIII付着末端とをこの順序で含む。得られたプラスミドpUC-NotIは、両端でNotI部位に直接フランクティングされた単一のHindIII部位を含む。

URA3座に組み込むべき複製カセットのターゲッティングのためのプラスミドを下記の手順で構築した。酵母URA3遺伝子源は、YR310に由来する1.1kbpのH

1リボヌクレアーゼ単位は、1吸収（absorbance）単位/分の A_{260} に対する A_{280} の変化を生起する量であると定義される。

incubationフラグメントであった[Parent, S. A. Jr, 1988, Yeast, 1, pp. 83-188]。プラスミドpUC-NotIをHindIIIで消化し、チウシ腸アルカリホスファターゼで酪リン酸化し、1.1kbpのHindIII-URA3フラグメントと連結して、プラスミドpUC-NotI-URA3を得た。

LY82座への複製カセットの組込みをターゲッティングするためのプラスミドを下記の手順で構築した。酵母LY82遺伝子を有するプラスミドYIp600[Barnes, D. A. 及びTheriot, J., 1986, Mol. Cell. Biol., 6, pp. 2828-2838]をEcoRI及びHindIIIで消化し、LY82遺伝子を有する4.5kbpのEcoRI-HindIIIフラグメントを、予めEcoRI及びHindIIIで消化したpUC19にクローニングした。次いでこのプラスミドをPvuII及びBglIIで消化し、LY82遺伝子を有する3.7kbpのPvuII-BglIIフラグメントをゲル精製し、平滑末端化した。プラスミドpUC-NotIをHindIIIで消化し、チウシ腸アルカリホスファターゼで酪リン酸化し、平滑末端化し、3.7

kbpのLYS2フラグメントと連結した。所期の構造を有する得られたプラスミドをpUC-NotI-LYS2 (pNLとも称する)で消化した。

LYS2での組込みのための第二のベクターも構築した。プラスミドY1p600をNcoIで消化し、LYS2クインク質コーディング配列の大部分を含む3.0kbpのNcoIフラグメントをゲル精製し、平滑化(平滑)末端化した。プラスミドpUC13をBamHIで消化し、平滑末端化し、3.0kbpのLYS2フラグメントと連結して、組込みベクターpUC13-LYS2を得た。

実施例 9

酵母アルファ因子分泌リーダーに融合したヒトPDIを産生する酵母株の構築

ヒトPDIコーディング配列源は、Pihlajaniemiら(1987、前出引用文献)によって記載されている重複部分的cDNAクローン、p210及びp1であった。ヒトPDI cDNAの5'末端を対するp210に由来する0.45kbpのEcoRI-PstIフラグメントをpUC13にクローニングして、プラスミドpUK

消化した。その結果得られた、成熟ヒトPDIコーディング配列を有する1.9kbpのHindIII-HindIIIフラグメントをゲル精製し、平めSmaI及びHindIIIで消化したプラスミドpGS4にサブクローニングした(pGS4はアルファ融合因子(前記α1)プロブレ分泌リーダー配列に融合した酵母GAL1プロモーターを有する；Shaw, K. J. ら, 1988, DNA, 11(7-126)。平滑末端化SmaI及びHindIII末端の間に形成された融合部は、MFα1プロブレリーダー配列とヒトPDI成熟部分との間の正確なインフレーム融合を再構築する(得られたプラスミドはpUKC161と命名した(第4図))。

LYS2組込みベクターpNL(pUC-NotI-LYS2)をSmaI及びXhoIで消化し、T4 DNAポリメラーゼでの処理によって平滑末端化した。プラスミドpUKC161をEcoRI及びHindIIIで消化し、その結果得られた、GAL10プロモーター-アルファ因子プロブレリーダー-ヒトPDI発現カセットを有する2.8kbpのEcoRI-HindIIIフラグメントをゲル精製し、T4 DNAポリメラーゼでの処理

C150を得た。次いで該プラスミドpUKC150をEcoRI及びXhoIで消化した(XhoIは成熟ヒトPDIをコードする配列の第三のアミノ酸に対応する位置で切断する)。得られた3.1kbpのベクター並列(backbone)フラグメントをゲル精製し、下記の構造のオリゴヌクレオチドアダプターと連結した：

5'-AAATTCGTTGACGCGC-3' (配列番号：8)

3'-GCACCTGC66GCGT-5' (配列番号：9)

該アダプターは成熟PDI(コーディング配列の5'末端を再構築し、所望の分泌リーダー配列への成熟ヒトPDI配列の正確な融合を可能にするような位置にHindIII部位を含む。

次いで、得られたプラスミドpUKC159をPstIで消化し、予リン酸化アルカリホスファターゼで処理し、ヒトPDIコーディング配列の残部を有するプラスミドpI(Pihlajaniemiら, 1987, 前出参考文献)に由来する1.5kbpのPstI-PstIフラグメントに連結して、プラスミドpUKC160を得た。このプラスミドpUKC160をHindIII(前記オリゴアダプター内で切断する)で消化し、次いでHindIIIで

によって平滑末端化した。前記平滑末端化pNLベクターフラグメントと該発現カセットフラグメントとを互いに連結し、放進結合物を用いてEcoRI株ATCC 85691を形質転換した。所期の構造を有するプラスミドを含むものについて形質転換体をスクリーニングし、得られたプラスミドpNL-MFα1-hPDIを多量に製造した。pNL-MFα1-hPDIをNcoIで消化すると、両端でLYS2 DNA配列にフランキングされた、2kbpの発現カセットが得られる。消化したDNAを用いて、スフェロプラスト法で(Hinnen A. ら, 1978, Proc. Nat'l Acad. Sci., USA, 75, pp. 1929-1933)、S. cerevisiae株BJ1995及びJRY188を形質転換した。NcoI末端はターゲティングデバイスとして作用しながら発現カセットを染色体LYS2座に同かわせ、該座で前記カセットが相同置換を介して組込まれた。形質転換体を、アルファアミノアシジン融合発現体増殖するものについてスクリーニングした(Chattop., B. B. ら, 1979, Genetics, 91, pp. 51; Barnes及びThornar, 1986, 前出

メントが記述な方向で挿入されたプラスミドpUC-ySP-hPDI (HDEL) 及びpUC-hSP-hPDI (HDEL) を得た。これらの二つのプラスミドをBamHIで消化し、発現カセットを有する二つの異なる1.5 kbのBamHIフラグメントをゲル精製し、次いでp401のBamHI部位に挿入して、それぞれpUC-GAL10p-ySP-hPDI (HDEL) 及びpUC-GAL10p-hSP-hPDI (HDEL) を得た。これらの二つのプラスミドをSmaI、SphI及びPvuIで消化した。得られた二つの2.5 kbのSmaI-SphIフラグメントをゲル精製し、平滑末端化し、次いで、予めXbaIで消化しておいたpUC13-LYS2と連結し、平滑末端化した。得られた二つのプラスミドpLYS2-ySP-hPDI (HDEL) 及びpLYS2-hSP-hPDI (HDEL) をHpaI及びEcoRVでの消化によって線形化し、次いで制限の反応で株BJ1995及びJRY188の形質転換に使用した。lys⁺形質転換体を、アルファアミノアジピン酸含有媒体で選択した。lys²座に組み込んだ両重の発現カセットを含む菌株を、ゲノムDNAのサザンブロット分析によって

EcoRVフラグメントの両方と連結してプラスミドpUC-MFα1-hPDI (HDEL) を得た。該プラスミドをBamHIで消化し、PDIカセットを有する1.7 kbのBamHI-BamHIフラグメントをゲル精製し、プラスミドp401 (第6図) のBamHI部位に挿入して、プラスミドpGAL-MFα1-hPDI (HDEL) を得た。次いで該プラスミドを酵素SmaI、SphI及びPvuIで消化し、その結果得られた、発現カセットを有する2.6 kbのSmaI-SphIフラグメントをゲル精製し、平滑末端化した。pUC13-LYS2ベクターをXbaIで消化し、平滑末端化し、次いで前述の2.6 kbの平滑末端化フラグメントに連結した。得られたプラスミドpLYS2-MFα1-hPDI (HDEL) をHpaI及びEcoRVで消化し、次いで株JRY188及びBJ1995の形質転換に使用した。得られた形質転換体を (実施例9に記載のように) ゲノムDNAのサザンブロットで筛选し、所望の発現カセットがLYS2座に組み込まれていることを確認した。JRY188形質転換体を株#127と命名した。

実施例 13

同定した。得られた株を、BJ1995/ySP-hPDI (HDEL)、BJ1995/hSP-hPDI (HDEL)、JRY188/ySP-hPDI (HDEL) (株#1268) 及びJRY188/hSP-hPDI (HDEL) (株#1267) と命名した。

実施例 12

酵母アルファ因子分泌リーダーを用いるヒトPDIのC末端HDEL突然変異体を過剰発現する酵母株の構築

プラスミドpUKC16I (第4図) をBamHI及びClaIで消化し、アルファ因子プロモーター配列とhPDIの5'-セグメントとを有する0.7 kbのBamHI-ClaIフラグメントをゲル精製した。プラスミドpUC-ySP-hPDI (HDEL) (実施例11に参照) をClaI及びEcoRIで消化し、C末端HDEL改変を有するhPDIの3'-セグメントを含む1.0 kbのClaI-EcoRIフラグメントをゲル精製した。pUC19をBamHI及びEcoRIで消化し、得られたベクターフラグメントを、0.7 kbのBamHI-ClaIフラグメント及び1.0 kbのClaI-

LYS2座の組み込み発現カセットから酵母PDIタンパク質を過剰発現する酵母株の構築

完全酵母PDI1遺伝子を有するプラスミドC7 (表2に記載) をEcoRVで消化し、酵母PDIタンパク質 (ORF) のC末端部分 (アミノ酸223からC7の末端まで) と3'非翻訳配列とを含む1.8 kbのEcoRV-EcoRVフラグメントをゲル精製し、プラスミドpAT153 (Twigg, A. G. 及びSheratt, D., 1980, Nature, 283, pp. 216-218) のEcoRV部位に挿入して、pUK169を得た。次いでプラスミドC7をBamI及びEcoRVで消化し、酵母PDI ORFのアミノ酸6~222をコードする0.67 kbのBamI-EcoRVフラグメントをゲル精製し、下記の合成オリゴヌクレオチドアダプターと連結した:

5'-GATCCACAAACAAATGAACTTTCTGCTG-3' (配列番号:16)

3'-GTGTTTGTGTTTACTTCATTAAGACGACG-5' (配列番号:17)

該オリゴヌクレオチドアダプターはそれぞれBamHI及びBamI付着末端を有し、酵母PDI ORFのアミノ酸1~5と12塩基対の酵母5'非翻訳リーダー配列とを

コードする。(ATG開始コドン以下抜粋で示されている)。
得られた0.7 kbpの BamHI - EcoRVフラグメントをゲル精製し、次いで、予め EcoRV及び BamHIで消化しておいたpAT153にサブクローニングして、プラスミドpUKC170を得た。

プラスミドpUKC169を EcoRVで消化し、その結果得られた、酵母PDIの前記C末端部分を有する1.3 kbpの EcoRV - EcoRVフラグメントをゲル精製し、次いでpUKC170の終反復 EcoRV部位に挿入し、それによって無量の(完全な)酵母PDI(yPDI)遺伝子を再生した。このようにして得たプラスミドをpUKC173と命名した。

pUKC173を EcoNIで消化し、yPDI遺伝子を有する得られた2.1 kbpフラグメントを平滑末端化し、ゲル精製した。pUC19を SacI及び SmaIで消化し、平滑末端化し、前記平滑末端化 EcoNI - yPDIフラグメントと連結した。遺伝子融合体を用いて E. coli DH5細胞を形質転換し、得られた形質転換体を、pUC19ポリリンカー内の BamHI部位がyPDIコーディング配列の5'末端に隣接して配置されるよう

に適切な方向でyPDI挿入体を含むプラスミドを含むものについてスクリーニングした。EcoNIフラグメント上のyPDI - ORFの5'末端には BamHI部位が既に存在していたため、該融合体(pUC19-yPDIと命名)はこの時点で、1.9 kbpの BamHIフラグメント上にyPDI - ORFを含む。pUC19-yPDI(を BamHIで消化し、yPDI遺伝子を有する1.9

BamHI - kbpフラグメントをゲル精製し、次いでベクターpUC18-GAL10p(B)ADHI:(ストック#491)(第8図)の BamHI部位にサブクローニングした。得られたプラスミドpUC18-GAL10p-yPDI-ADHI(例7図)はストック#1015である。プラスミドpUC18-GAL10p-yPDI-ADHIを SmaI、SphI及び SacIで消化し、発現カセットを有する2.7 kbpの SmaI - SphIフラグメントをゲル精製し、平滑末端化し、次いでpUKC171(pUKC171は、予め EcoKI及び HindIIIで消化しておいたpUC19にサブクローニングしたY1p600(Barnes及びThorne, 1986, 前出引用文献)の4.5 k EcoRI -

HindIII - LYS2フラグメントを含む)の反復 SilI部位にクローニングした。得られたpUKC171-GAL10p-yPDIベクターを EcoRI及び PvuIIで消化して LYS2-GAL10p-yPDI-ADHI - LYS2カセットを分離し、これを用いて E. coli lys188及び lys1995を形質転換した。得られた⁺lys⁺形質転換体を、実施例9に記載のように、ゲノムDNA調製物のサザンブロットにより評価した。LYS2座に組込まれたGAL10p-yPDIカセットを有する菌株の単離体が検出された。得られた株をB11995/yPDI及びIRY188/yPDI(株#1152)と命名した。

実施例 14

URA3座への組込み発現カセットから酵母PDIを過剰産出する酵母株の構築

プラスミドpUC-NOT-URA3(実施例8)を PstI及び NcoIで消化し(URA3遺伝子の一部分を欠失させるため)、平滑末端化した。プラスミドpUC18-GAL10p-yPDI-ADHI(を EcoRI、

SacI及び SphIで消化し、GAL10p-yPDI-ADHI:発現カセットを有する2.8 kbpの EcoRI - SphIフラグメントをゲル精製し、平滑末端化し、前記ベクターフラグメントと連結して、プラスミドpNU-GAL10p-yPDIを得た。NcoIでの消化により、pNU-GAL10p-yPDIからURA3組込みカセットを切り出した。得られた線形フラグメントを用いて酵母株KHY107を形質転換した。5-フルオロ-オロト酸含有固体培地上で(Boekeら, 1984, Mol. Gen. Genet., 197, pp. 545)、ura⁻形質転換体を選択した。得られたura⁻形質転換体から得るゲノムDNAを Eg1(1で消化し、GAL10p-yPDI-ADHIカセット由来の放射線標識した EcoRI - PvuIIフラグメントをプローブとして用いて、サザンブロットにより評価した。前記のGAL10p-yPDI-ADHI:発現カセットを URA3に組込んだ菌株が同定された。単離体K-Y1は、URA3に組込まれた複製のコピーを有していた(株#1138)。単離体K-Y3は、URA3に組込まれたコピーを一つだけ

有していた（株#1137）。

実施例 15

組織培養液内のPDIタンパク質量の検出

酵母株を、3×YEPの液体培地で、23℃で24時間増殖させた。24時間が経過した後、培養物にガラクトースを最終濃度4、8%まで加えた。次いで培養物を23℃で更に24時間再インキュベートした。あるいは、酵母株を3×YEPDで30℃で24時間培養した。細胞を回収し、無効冷水で洗浄し、同量の3×YEPD-ガラクトース培地に再懸濁させた。酵母液を更に16～25時間インキュベートし、その後回収し、タンパク質を抽出方法2（下記）で抽出した。

タンパク質の抽出：

本質的にMeiliorらの方法（1983, Gene, 24, pp. 1-14）に従い、ガラスビーズ破壊法を用いて、指数増殖細胞又は定常期細胞からタンパク質を抽出した。

方法1：2.5mMリン酸塩緩衝液pH7、0.4%のPMSEF（0.5mM）の存在下で細胞壁のガラスビーズ破壊を

クリルアミドゲル及びレーン当たり10μgのローディングされたタンパク質（タンパク質抽出方法1）。極度のゲル中でSigma予備染色分子重量標準を使用した。ゲルはBioRad mini-Protein 11ゲルシステムで操作した。タンパク質濃度を計算せずに、細胞外抽出物をレーン当たり15～20μlでローディングした。電気泳動の途中、電圧は200ボルト以下に維持した。

BioMetra転写機ウエスタンブロットシステムを用いて、タンパク質をニトロセルロースにトランスファーした。ニトロセルロース膜を5%（w/v）粉乳で1時間ブロックし、洗浄し、1:500～1:750の希釈度で8時間から一夜にわたり、抗ヒトPDIポリクローナル抗体と共にインキュベートした。膜を洗浄し、ペルオキシダーゼ結合抗ウサギγGを最終希釈度1:100で加え、インキュベーションを1時間続けた。洗浄後、Amersham ECLキットを製造業者の指示通りに使用して、ブロットを発色した。

最初のアッセイでは、株3072Aが分泌するPDIをウエスタンブロットで検出できるレベルで産生することが判明した。使用したECLプロトコルでは、検出レベルは0、

行い、次いで凍結-融解サイクルにかけてタンパク質を抽出し、13,000rpmで10分間の遠心分離により可溶性タンパク質を回収した。PEG（固体）、硫酸アンモニウム（0～80%）又は超ろ過膜（<100kDa）での凍結の前又は後で、液相培養液の分析により最初に分泌を評価した。タンパク質濃度はBradfordの方法（1976, Anal. Biochem., 72, pp. 248-254）で測定した。

方法2：方法1に従って、但し培養培地にNaOH及びターナルカプトエタノールを（それぞれ最終濃度0.2M及び1%で）加え、氷上に約10分間放置し、その後TCAを最終濃度8%で加えて、細胞内試料を調製した。氷上で30分間静置した後、遠心分離によってタンパク質を回収し、冷アセトンで洗浄し、SDS-PAGEローディング緩衝液に再懸濁させた。

50μgの全可溶性タンパク質を、本質的にSchaeleらの方法（1987, Gene, 54, pp. 119-23）に従って、一次元SDS-PAGE（12%ポリアクリルアミド）とクーマシーブルー染色とで分析した。

次の条件で電気泳動を実施した：10%SDS-ポリア

0.5μgの精製ワシPDIであった。この分泌PDIは、100kDaカットオフ限外濾過膜によって保持されたため、二量体であることが判明した。株1072Aと対応するHDB1変異株（1279）とを比較すると、ヒトPDIは両方から分泌されていた。この実験では、最終濃度/誘導条件を、増殖温度（℃）及び誘導期間について最適化した。所記二つの株は、23℃で培養し次いで30℃で18時間誘導するか、又は30℃で18時間培養し誘導すると、より高いPDI合成レベルを示した。

実施例 16

酵母内でアンチスタチンを発現させるためのベクターの調製

アンチスタチンは血液凝固因子Xaの強力なタンパク質阻害物質である。アンチスタチン（ATS）は、メキシコヒルHaementeria officinalisの唾液腺から単離された（Nuti, 等, 1988, J. Biol. Chem., 263, pp. 10162-10167）。その後、ATSをコードするcDNAがHan, J. H. により単離され、特徴が解明された（1989,

Gene, 15, pp. 47-57)。ATSは、超酸素酵母によって分泌された異種タンパク質中の折り畳み及び最適なジスルフィド結合の形成に対する高レベルのPDI活性の影響を評価する上で理想的なリポータータンパク質である。なぜならATSは、タンパク質が生物学的活性を有するようにするために正確な対を形成しなければならない10個のジスルフィド結合を有するからである。

発現ベクターpKH4α2 (Jacobsen, M. A., 1989, Gene, 85, pp. 511-516)を用いて、酵母内でATSを発現させた。前記ベクターは、ガラクトース誘導性GAL10プロモーターと、異種タンパク質の分泌を制御するための酵母MFA1プロセソリナー配列とを含む。ATSをコードする配列は、クローンスC-4 (Hon, J. B., 9, 前出引用文献)に由来するサブクローニングしたATS cDNAを基質として使用し且つ下記のオリゴヌクレオチドプライマーを用いて、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)法で単離した。

1. 5'-ATATGGATCCTGTCCTTGGATAAAAGACAAAGGAGCATTGGAGCCGGGTGT-3' (配列番号: 18)

2. 5'-TATAGGATCCTTATGATTAAGCGTGGGATTAAGCTT-3'

表1

| 形質転換株 | 宿主株 | 元の株 | PDI ⁺ カセット |
|-------|-------|--------|-----------------------|
| 990 | 239 | JRY188 | なし |
| 1105 | 1072A | JRY188 | アルファ-hPDI |
| 1176 | 1157 | JRY188 | ySP-hPDI |
| 1175 | 1148 | JRY190 | hSP-hPDI |
| 1293 | 1279 | JRY188 | alpha-hPDI(HDEL) |
| 1294 | 1267 | JRY188 | hSP-hPDI(HDEL) |
| 1293 | 1268 | JRY188 | ySP-hPDI(HDEL) |
| 1177 | 1252 | JRY188 | yPDI |
| 1156 | 548 | KRY107 | なし |
| 1154 | 1136 | KRY107 | yPDI-A1 |
| 1155 | 1137 | KRY107 | yPDI-A3 |

+ PDIカセット及び株は次のように実施例に記載されている: アルファ-hPDI、実施例9; ySP-hPDI及びhSP-hPDI、実施例10; hSP-hPDI (HDEL)及びySP-hPDI (HDEL)、実施例11; アルファ-hPDI (HDEL)、実施例12; yPDI、実施例13; yPDI-A1及びyPDI-A3、実施例14。

* 形質転換株はK991アンチスタシン発現ベクターを含む。

(配列番号: 19)

これらのプライマーは両方とも、PCR産物のサブクローニングを容易にするためにBamHI部位を含む。第一のプライマーは、酵母KEX2 yscドメインプロテアーゼ開裂部位(Lys-Arg)N末端を、成熟ATSの熟アミノ酸残基に挿入する(酵母yscドメインプロテアーゼは該配列中のLys-Arg部位のC末端側で開裂する)。PCR産物をBamHIで消化し、ゲル精製し、次いでBamHI消化pKH4α2に連結して、pKH4α2/ATS (K991) (第8図)を得た。次いでこの発現ベクターを用いて、スフェロボラスト法(Hinnenら, 1978, 前出引用文献)で、表1に示す酵母宿主株を形質転換した。

ロイシンを含まない合成固体培地(Schultz, L., 1987, Gene, 61, pp. 123-133)上で形質転換体を選抜し、クローン単離体についてストリークし、これらの単離体を後述の分析で使用した。株は、17%グリセロール含有合成培地中で-70℃で貯蔵することにより保存した。

実施例 17

アンチスタシンの分泌に関する観察及びPDI過剰産生株の増殖及び評価

K991形質転換株JRY188株を、酵母もしくはヒトPDIを過剰産生する種々の形質転換株とを、下記の方法でアンチスタシンの分泌に関して評価した。指示された株を-70℃冷凍グリセロールストックからロイシン無含有合成寒天プレート上にストリークし、30℃で3日間増殖させた。5mlの3xYEH D [60g Difco酵母抽出物、30g H₂SO₄ペプトン、48g グルコース/l]培地を入れた培養管(18x150mm)に小ループ様の細胞を接種し、回転培養コーターで23℃で約18時間インキュベートした。この段階で、ガラクトースを最終濃度4.8% (w/v)で加えて細胞を誘導し、培養物を23℃で更に5日間インキュベートした。次いで、遠心分離で細胞を回収し、清濁化培地上清をアンチスタシン活性のアッセイのために保持し、誘活性を因子Xa活性の阻害によって測定した(Naito, B., 1989, 前出引用文献)。該実験は三つ組で実施した。結果を要約して表2に示す。

表2

| 株 | AT5 / 1.000 | 相対レベル |
|-------------------|-------------|-------|
| JRY188 | 23.6 | 1.0 |
| JRY188/hSP-hPDI | 24.4 | 0.95 |
| JRY188/ySP-hPDI | 28.4 | 1.11 |
| JRY188/alpha-hPDI | 27.2 | 0.9 |
| JRY188/yPDI | 65.1 | 2.54 |

実施例 18

JRY188及びHDBL突然変異体形とPDIを過剰発生する同株株によるアンチスタチン分泌の評価

K991形質転換JRY188と、三つの異なる分岐リダーを有するHDBL突然変異体形とPDIを過剰発生する形質転換同株株とを実施例17に記載のように増殖し、清澄化培地を、実施例17に記載のように因子Xa阻害アッセイで分岐AT5レベルについて評価した。結果は表3に示す。

表3

| 株 | AT5(mg/L) | AGRP | AT5/AGRP |
|-----------|-----------|------|----------|
| KRY107 A1 | 0.314 | 23.9 | 0.013 |
| KRY107 A2 | 0.244 | 24.5 | 0.010 |
| KRY107 A3 | 0.334 | 25.6 | 0.013 |
| K-Y1 A1 | 1.166 | 24.8 | 0.047 |
| K-Y1 A2 | 1.469 | 21.8 | 0.067 |
| K-Y1 A3 | 1.483 | 23.3 | 0.059 |
| K-Y3 A1 | 3.856 | 39.0 | 0.099 |
| K-Y3 A2 | 2.144 | 31.2 | 0.069 |
| K-Y3 A3 | 1.929 | 40.0 | 0.048 |

K-Y1は、URA3に多量コピー-GAL-yPDIを有するKRY107である。

K-Y3は、URA3に単一コピー-GAL-yPDIを有するKRY107である。

表3

| 株 | AT5 / 1.000 | 相対レベル |
|-------------------------|-------------|-------|
| JRY188 | 18.0 | 1.0 |
| JRY188/hSP-hPDI(MDEL) | 27.5 | 1.53 |
| JRY188/ySP-hPDI(MDEL) | 29.2 | 1.62 |
| JRY188/alpha-hPDI(MDEL) | 21.3 | 1.18 |

実施例 19

酵母株KRY107及び酵母PDIを過剰発生する同株株によるアンチスタチンの分泌

K991形質転換KRY107と、酵母PDIを過剰発生する同株株の形質転換同株株とを増殖し、清澄化培地を、実施例17に記載のように因子Xa阻害アッセイで分岐AT5レベルについて評価した。結果は表4に要約して示す。

A1、A2及びA3は、平行して評価した指示された株の種々のクローン単離体を示す。

酵母PDIの過剰発生の結果、単離株K-Y3-A1の場合は、AT5活性の分泌が細胞当たりベースで4倍に増加し、培養ベースで約8倍の分泌が観察される。

実施例 20

多重コピープラスミドから酵母PDI又はヒトPDIを過剰発生する酵母宿主株の構築

多量コピー酵母シャトルベクターYEp24 (Bott et al., D. G., 1979, Gene, 8, pp. 17-24) は、酵母2ミクロンDNA複製起点と、タタシル結合有合成造地で選択するための酵母URA3遺伝子を含む。YEp24をEamHIで消化し、得られた2.8 kbpのEamHIベクターフラグメントをゲル精製した(フラグメントa)。プラスミドpUC18-GAL10p-yPDI-ADH1((#1015) をEcoRI、SphI及びScaIで消化した。その結果得られた、GAL10p-yPDI-ADH1(図2カセット) を有する2.8 kbpのEcoRI-SphIフラグメントをゲル精製した(フラグメントb)。プラスミドpUC181

を EcoRI 及び HindIII で消化し、GAL1 プロモーターブレブローヒト PD1 発現カセットを有する 2.8 kbp の EcoRI-HindIII フラグメントをゲル精製した（フラグメント c）。前記三つのフラグメントを平滑末端化し、次いで下記の形態で互いに連結した：（1）ベクターフラグメント a 及びフラグメント b を互いに連結してプラスミド YEp24-GAL10p-YPD1（第 10 図）を得る；（2）ベクターフラグメント a 及びフラグメント c を互いに連結してプラスミド YEp24-GAL10p-MFα-hPD1（第 13 図）を得る。得られた前記二つのプラスミド DNA の大規模 CsCl 製造を行った。二つの別個の形質転換反応で、酵母株 RY188 を ATS 発現ベクター K993（実施例 10）及び YEp24-GAL10p-YPD1 もしくは YEp24-GAL10p-MFα-hPD1 で同時形質転換した。両方のプラスミドを含む形質転換体を、ロイシン及びウラシルの両方を欠失した合成培地で選抜し、単離した単克隆（single colony）を同一培地上で再ストリークしてクローン単克隆を選抜した。二つの元の同時形質転換の各々について 5 個の前記クローン単克隆を、培養管内の

5 ml の 3 x Y2HD 培地に接種し、組織培養ロータードラムで 23℃ で 24 時間インキュベートした。24 時間が経過した後、ガラクトースを最終濃度 4.8% で加え、培養物を 23℃ で更に 5 日間インキュベートした。遠心分離によって細胞を回収し、溶融化培地と清を因子 Xa 阻害ブッセイで ATS 活性レベルについてアッセイした。YEp24-GAL10p-YPD1 プラスミド及び ATS 発現ベクターを含む同時形質転換体は、ATS 発現ベクターのみを含む親 RY188 株と比べると、単離体に応じて 3〜20 倍の分画 ATS 活性レベルを示した。YEp24-GAL10p-MFα-hPD1 プラスミドと ATS 発現ベクターとを含む同時形質転換体は、ATS 発現ベクターのみを含む親 RY188 株と比べて、2〜3 倍の分画 ATS 活性レベルを示した。

実施例 2.1

前述の発現クンバク質の発現に使用した同一発現ベクターから酵母又はヒト PD1 を過剰産生する酵母宿主株の構築及び評価

S. cerevisiae GAL1 及び GAL10 発

現子を、分岐型（divergent）GAL1 及び GAL10 プロモーターとこれら二つのプロモーターの TAT A ボックスの間に位置する共通 OAL4 結合ドメインとを含む二つの構造遺伝子の間の領域から分岐的に（divergently）転写した。プラスミド pBM272（Johnson, M. 及び Davis, R., 1984, Mol. Cell. Biol., 4, pp. 1440）は、この分岐型酵母 GAL1-GAL10 プロモーターを 0.85 kbp の EcoRI-HindIII フラグメントとを含む（HindIII 部位に隣接した内部 BamHI 部位を有する）。このプロモーターフラグメントを使用して、分岐型プロモーターカセットベクター pUC-GAL1/10 を構築した。該ベクターは次の特徴を有する：非反復 EcoRI 及び SmaI 部位により、この順序で、酵母 ADHI 転写ターミネーター（0.35 kbp HindIII-3.2kbI フラグメント）から分離した酵母 GAL10 プロモーター。非反復 BamHI 及び HindIII 部位により ADHI 転写ターミネーターの第 2 のコピーから分離した酵母 GAL1 プロモーター。二つの ADHI ターミネーターエレメントの 3' 末端は、分岐型プロモーター

発現カセット全体を SphI フラグメントとして単離できるように、SphI 部位によってフランクングされている。このプラスミド内のベクター領域は、ポリリンカーの代わりに前記発現カセットを有する pUC18 である。

プラスミド pUC-GAL1/10 を BamHI で消化し、ゲル精製してフラグメント「a」を形成した。プラスミド pUC18 を BamHI で消化し、成熟ヒト PD1 コーディング配列にインフレーム融合したアルファ因子ブレブローグーを有する 1.9 kbp の BamHI フラグメントをゲル精製し、ベクターフラグメント a に連結して、プラスミド pUC-GAL1/10-hPD1 を得た。該プラスミドでは、アルファ因子ブレブロー hPD1 融合が GAL1 プロモーターの制御下にある。プラスミド pUC18-GAL10p-PD1-ADHI1（実施例 13）を BamHI で消化し、その結果得られた、酵母 PD1 コーディング配列を有する 1.7 kbp の BamHI フラグメントをゲル精製し、次いでベクターフラグメント a に連結して、プラスミド pUC-GAL1/10-YPD を得た。該プラスミドでは、GAL1 プロモーターが酵母 PD1 の発現を制御する。このようにして得た二つのブ

ラスミドを SacI で消化し、平滑末端化し、それぞれ hPDI 及び yPDI のセットを有するベクターフラグメント b 及び c を得た。

A T S 発現ベクター (K991) を SacI 及び BglI で消化し、成熟 A T S のコーディング配列にインフレーム融合したアルファ因子プロリーダーを有する SacI - BglI フラグメントをゲル精製し、平滑末端化し、別個の反応で二つの平滑末端化ベクターフラグメント b 及び c に連接した。制限地図で調べて正確な構造を有する得られたプラスミドを、それぞれ pUC-GAL1/10-hPDI/A T S (第11図) 及び pUC-GAL1/10-yPDI/A T S (第12図) で消化した。これらの二つのプラスミドを SphI で消化して発現カセットを遊離させ、hPDI 関連又は yPDI 関連発現カセットを有するフラグメントを、予め SphI で消化した酵母シールドベクター pCI/1 (Rosenberg, S. 他, 1984, Nature, 312, pp. 77-80) と連接した。その結果、二つのプラスミド、pCI/1-GAL1/10-hPDI/A T S 及び pCI/1-GAL1/10-yPDI/A T S が得られた。これらのプラス

ミドでは、A T S 及び P D I 関連発現カセットが、それぞれ GAL10 及び GAL1 プロモーターの制御下で同一の高コピー数ベクター上に存在していた。

次いでこれらの二つの発現ベクターを用いて、酵母株 J R Y 188、S J 1995 及び他の適当な酵母宿主株を形質転換した。形質転換体をロイシン無含有培地上で選択し、得られた形質転換体を、上記実施例に記載のように、A T S 及び P D I の発現/分泌について評価した。

表5 (下記) に示す結果から明らかなように、hPDI を過剰産生する菌株は、pKH4 α 2/A T S のみを含む対照株と比べて数倍高いレベルのアンチスタシンを分泌する。また、酵母 PDI を過剰産生する菌株は、対照株と比べて3~17倍高いレベルのアンチスタシンを分泌した。

表5

| 菌株株 | アンチスタシン (mg/L)* |
|---------------------------------|-----------------|
| <u>pCI/1-GAL1/10-hPDI/A T S</u> | |
| 菌株株 1 | 4.2 |
| 菌株株 2 | 5.3 |
| 菌株株 3 | 3.9 |
| 菌株株 4 | 4.6 |
| 菌株株 5 | 5.1 |
| <u>pCI/1-GAL1/10-yPDI/A T S</u> | |
| 菌株株 1 | 3.9 |
| 菌株株 2 | 11.7 |
| 菌株株 3 | 3.8 |
| 左5株を | |
| 菌株株 4 | 26.0 |
| 菌株株 5 | 8.2 |
| JRY188 対照 | 1.5 |

* 28℃で培養後5日目の収量。

実施例 2.2

P D I 過剰産生酵母宿主株によるアンチスタシン分泌の増加に対する温度の効果

アンチスタシン発現ベクター pKH4 α 2/A T S 及び YE ρ 24-GAL1p-MF α -hPDI もしくは YE ρ 24-GAL10 ρ -yPDI で同時形質転換した株 J R Y 188 の導出した菌株株を、23℃又は30℃での増殖後にアンチスタシン分泌について評価した。アンチスタシン発現ベクターのみで形質転換した菌株株 J R Y 188 を平行して増殖した。3x YE H D 培地で23℃又は30℃で一晩増殖した後、ガラクトースを最終濃度4.8%で加えて細胞培養物を誘導し、23℃又は30℃での増殖温度で更に5日間増殖した。誘導後3~5日で採取した増殖液を、因子 X a 阻害アッセイにより分泌アンチスタシンレベルについて評価した。表6の結果から明かなように、アンチスタシン発現は、P D I を過剰発現する全ての菌株株について、誘導後3日目及び5日目の両方で、温度を30℃にした時よりも23℃にした時の方が遥かに大きかった。

表6

| 菌株名 | 温度 (°C) | アンチスタチン (mg/L) | |
|-----------|------------|----------------|-------|
| | | 2日目 | 5日目 |
| hPDI-1 | 23 | 0.83 | 2.11 |
| hPDI-2 | 23 | 1.14 | 2.69 |
| yPDI-1 | 23 | 5.93 | 10.25 |
| yPDI-3 | 23 | 3.00 | 15.92 |
| JRY159 対照 | 23 | 0.38 | 0.65 |
| hPDI-1 | 30 | 0.49 | 0.47 |
| hPDI-2 | 30 | 0.42 | 0.47 |
| yPDI-1 | 30 | 2.29 | 4.65 |
| yPDI-3 | 30 | 2.71 | 2.56 |
| JRY159 対照 | 30 | 0.34 | 0.30 |

* 種々のhPDI菌株体は、アンチスタチン発現ベクターKH4及びYEp24-GAL10p-MFα1-PDIの両方を含んでいた。yPDI菌株体は、ベクターKH4及びYEp24-GAL10p-yPDIの両方を含んでいた。

TAPをコードする合成遺伝子にインフレーム融合した真正 (authentic) MFα1プレプロリーダー配列を含む第二のTAP発現ベクターpKH4-3B/TAPを構築した。合成TAP遺伝子を含むプラスミドpKH4-TAP (Neeperrら, 1990, 前出引用文献) を、合成TAP遺伝子の5'末端及び3'末端をそれぞれ改変するために、下記の二つのオリゴヌクレオチドプライマー

5'-TACAAACGTC TGTGCTCAAG-3' (配列番号: 20) 及び
5'-ACTGGATCCG AATTCAGCT TAGATGCAAG CGT-3' (配列番号: 21)

を用いるポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) で、DNA断片として使用した。

該PCR反応は、当業者によく知られている方法 (Innis, M. A. ら編, 1990, PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, Academic Press, Inc., San Diego, CA) で実施した。得られたPCR産物をT4ポリヌクレオチドキナーゼでリン酸化し、BamHIで消化し、次いでゲル精製して、TAP

PDIを過剰産生する担体酵母株によるマダニ抗凝血ペプチド (TAP) の分泌

マダニ抗凝血ペプチド (TAP) は、血凝凝固因子Xaの強力な高選択性阻害物質である [Waxman, L. ら, 1990, Science, 248, pp. 593-596]。TAPはマダニ *Ornithodoros moubaitia* から単離された新規のセリンプロテアーゼ阻害物質である。TAPは、6個のシステイン残基を含む99個のアミノ酸からなる (Waxmanら, 1990, 前出引用文献)。TAPは、ガラクトース誘導性 Gal10 プロモーターと、TAPをコードする合成遺伝子にインフレーム融合した酵母MFα1プレプロリーダー配列とを含む発現ベクターpKH4-TAPを用いて、酵母内で発現された (Neeperr, M. ら, 1990, J. Biol. Chem., 265, pp. 17746-17752)。このベクターは、プレプロリーダーのアミノ酸79の位置に配置されたBamHIクローニング部位の存在に起因して、少し改変されたMFα1プレプロリーダー配列を含む (Neeperrら, 1990, 前出引用文献)。

TAPコーディング配列の正確なる'末端に平滑末端を有し、塩基終結コドンの3'側に付着BamHI末端を有する、0.2kbのプラントBamHIフラグメントを得た。

ベクターpKH4-3B (Hoffman, K. 及びSchuliz, L. D., 1991, Gene, 101, pp. 103-111) は、MFα1プレプロリーダーコーディング配列の3'末端に相反度SphI部位を含む。pKH4-3BをSphIで消化し、T4 DNAポリメラーゼで処理して平滑末端化し、BglIIで消化した。得られたプラントBglIIベクターフラグメントをゲル精製し、前述の0.2kbプラント-BamHI-TAPフラグメントに連結して、ベクターpKH4-3B/TAPを得た。

別個の形質転換反応で、酵母株BJ1995、JRY159及びURIを、ベクターYEp24-GAL10p-yPDI及びpKH4-TAPもしくはpKH4-3B/TAPで同時形質転換した。両方のプラスミドを含む同時形質転換体を、ロイシン及びガラクトースの両方を欠失した合成培地上で選択し、単離した単克隆を同一培地上で再ストリ

ークして、クローン単離体を選択した。種々のベクター／宿主同時形質転換の各々について三つの前記クローン単離体を、培養管内の5 ml の4%グルコース含有ウラシル欠失改質 *xLeu⁻* 培地 (3 *xLeu⁻Ura⁻*) に接種した。該培養物を組織培養ローラードラム内で30℃で24時間インキュベートした。24時間が経過した後、細胞を遠心分離によって回収し、4%ガラクトースを含む5 ml の5 *xLeu⁻Ura⁻* 培地に懸濁させた。得られた培養物を30℃で更に48時間インキュベートした。次いで細胞を遠心分離によって回収し、清澄化培地試料をSCX-MPLC又は因子Xa阻害アッセイにより分泌TAPレベルについて評価した (Wassmann, 1999, 特出引用文献)。別の方法として、相換え酵母細胞を23℃で24時間増殖し、ガラクトースを最終濃度4%で加えることにより誘導し、次いで23℃で更に5日間インキュベートした。次いで、清澄化培地試料を前述のように分泌TAPレベルについて評価した。

配列番号: 3

配列の長さ: 6 アミノ酸

配列の型: アミノ酸

鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: ペプチド

配列

```

Trp Cys Gly Pro Cys Lys
1             5

```

配列番号: 4

配列の長さ: 10 アミノ酸

配列の型: アミノ酸

鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: ペプチド

配列

```

Phe Tyr Ala Pro Trp Cys Gly His Cys Lys
1             5             10

```

配列番号: 5

【配列表】

配列番号: 1

配列の長さ: 6 アミノ酸

配列の型: アミノ酸

鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: ペプチド

配列

```

Trp Cys Gly Val Cys Lys
1             5

```

配列番号: 2

配列の長さ: 4 アミノ酸

配列の型: アミノ酸

鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: ペプチド

配列

```

His Asp Glu Leu
1

```

配列の長さ: 30 塩基対

配列の型: 核酸

鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: cDNA

配列

```

GTTACAGTGA CCACACCATG GAGCGTAGAA

```

30

配列番号: 6

配列の長さ: 26 塩基対

配列の型: 核酸

鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: cDNA

配列

```

AATTGGGGCC GCAAGCTTGC GGGCGC

```

20

配列番号: 7

配列の長さ: 26 塩基対

配列の型: 核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：c D N A

配列

AGGTGGGGCC GCGGCTTGC GGGCGC 26

配列番号：3

配列の長さ：15塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：c D N A

配列

ATTTCCTTGA GGGCC 15

配列番号：9

配列の長さ：15塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：c D N A

配列

TGGGGGGCT GGGGGGGAC GAGGGGGAG GAGGGGGAG AGAGGAGAGT GGGGGGGAG 40
ATTTGGTTT GTG 73

配列番号：12

配列の長さ：88塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：c D N A

配列

GATGACAAA AGAATGAA GTTTCTGCT GGGGGGGGC TGTGATGTC GTTCTGTGTC 60
GAGGCTGCT GTTGTGTC GAGGGGC 88

配列番号：13

配列の長さ：88塩基対

配列の型：核酸

配列の種類：c D N A

配列

TGGGGGGCT GAGGC 16

配列番号：10

配列の長さ：73塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：c D N A

配列

GATGACAAA AGAATGAA GTTTCTGCT GGGGGGGGC TGTGATGTC TGGGTGTC GAGGCTGTC 60
GAGGCTGCT GTG 73

配列番号：11

配列の長さ：73塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：c D N A

配列

TGGGGGGCT GGGGGGGAG AGAGGGGGG GTTGGGGG AGAGGATGA GAGGAGGGA 60
GAGGAGAA AGTGTATTT GTTTGTC 80

配列番号：14

配列の長さ：91塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：c D N A

配列

GAGGCTGCT AGGCTGTA AGAGGAGAG GAGGAGAG GAGGAGAA GAGGAGAG 60
AGAGGCTGCT AGGAGAGT GAGGAGAG 91

配列番号：15

配列の長さ: 95塩基対

配列の型: 核酸

塩の数: 一本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: c D N A

配列

AATTCGAGTC CTATAGATTC ATGCTGACG CCGTCGCGT CATCGCTTC 90
 CTGCGTATCT GCGTCGCTG CTTCCTGAG GTGCTGAGG TCGTC 95

配列番号: 16

配列の長さ: 81塩基対

配列の型: 核酸

塩の数: 一本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: c D N A

配列

GATCCACAAA ACGAAATGAA GTTTCTGCT G 31

配列番号: 17

配列の型: 核酸

塩の数: 一本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: c D N A

配列

TATAGGATCC TTATGATAAG CGTGGGATAA GCTT 24

配列番号: 20

配列の長さ: 20塩基対

配列の型: 核酸

塩の数: 一本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: c D N A

配列

TTCAGCGTC TGTGATCAG 20

配列番号: 21

配列の長さ: 33塩基対

配列の型: 核酸

塩の数: 一本鎖

配列の長さ: 31塩基対

配列の型: 核酸

塩の数: 一本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: c D N A

配列

GCAGCAGGAG AAAACCTTCAT TTTGTTTGT G 31

配列番号: 18

配列の長さ: 51塩基対

配列の型: 核酸

塩の数: 一本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: c D N A

配列

AGATGATGCG TGTCTTTCGA TAAAGAGCAA GCGGCTTTC GACCGCGTC T 31

配列番号: 19

配列の長さ: 34塩基対

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: c D N A

配列

ACTGGATCCG AATTCAAGCT TAGATGCAAG CGT 33

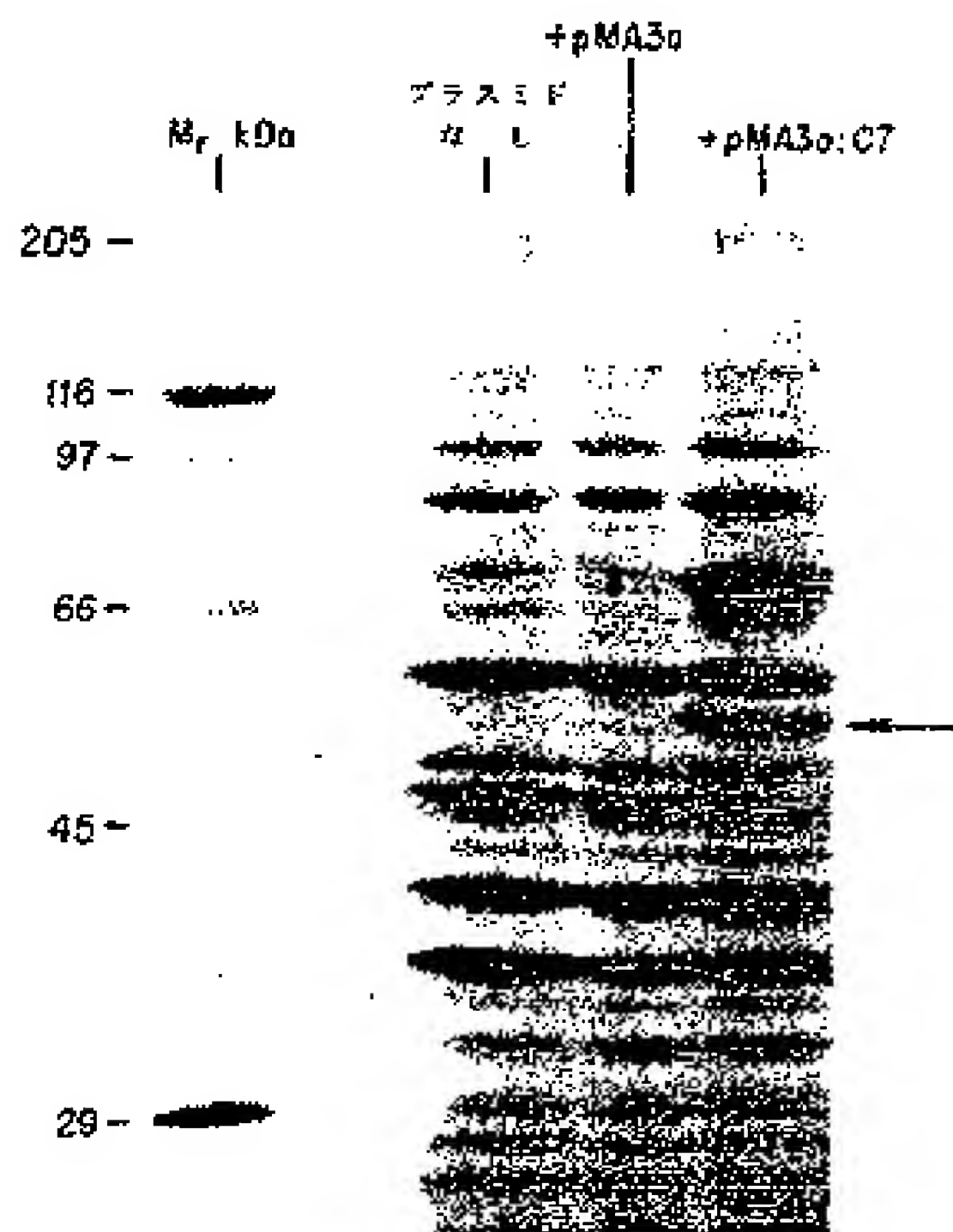


FIG. 1

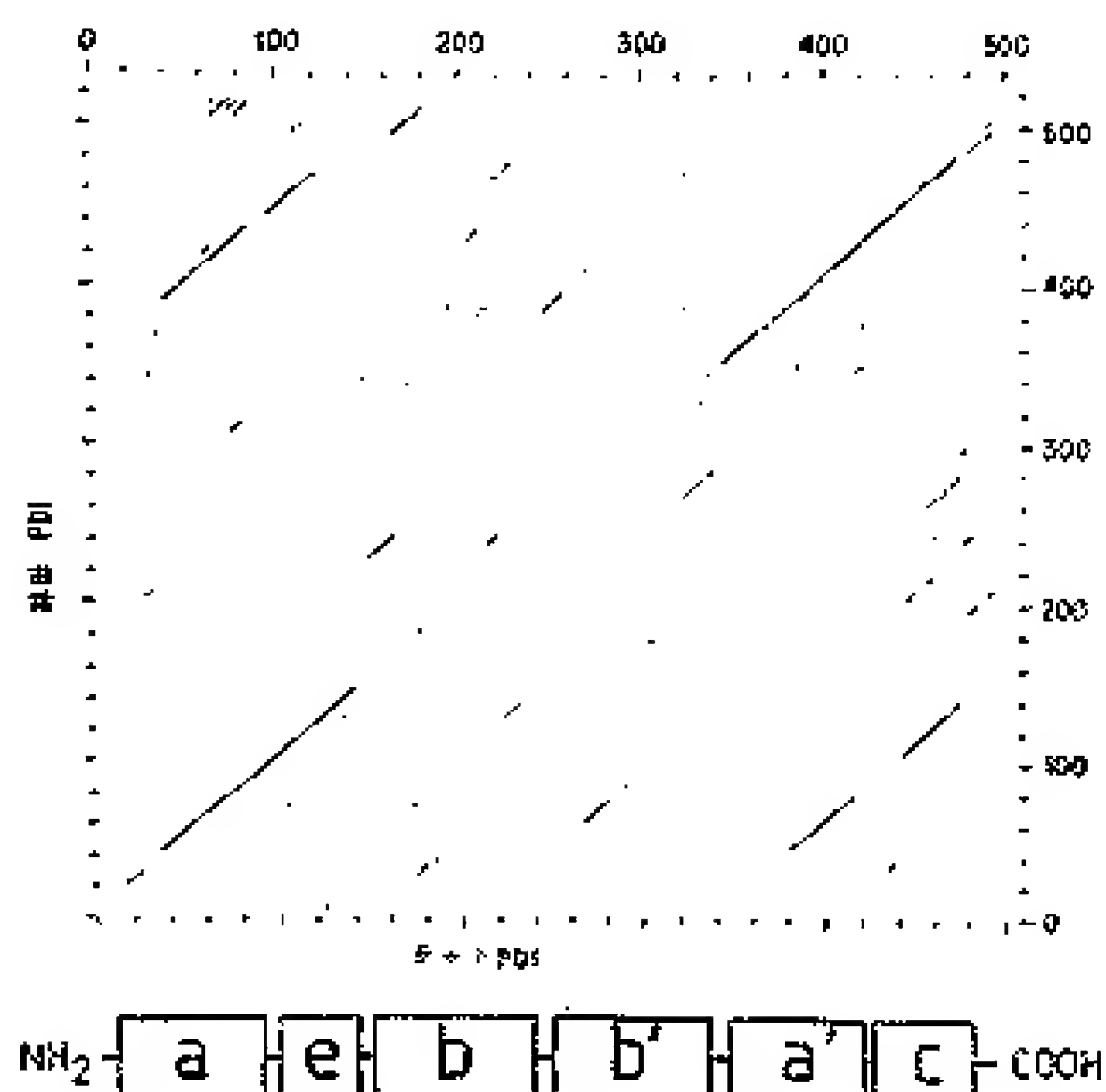


FIG. 2

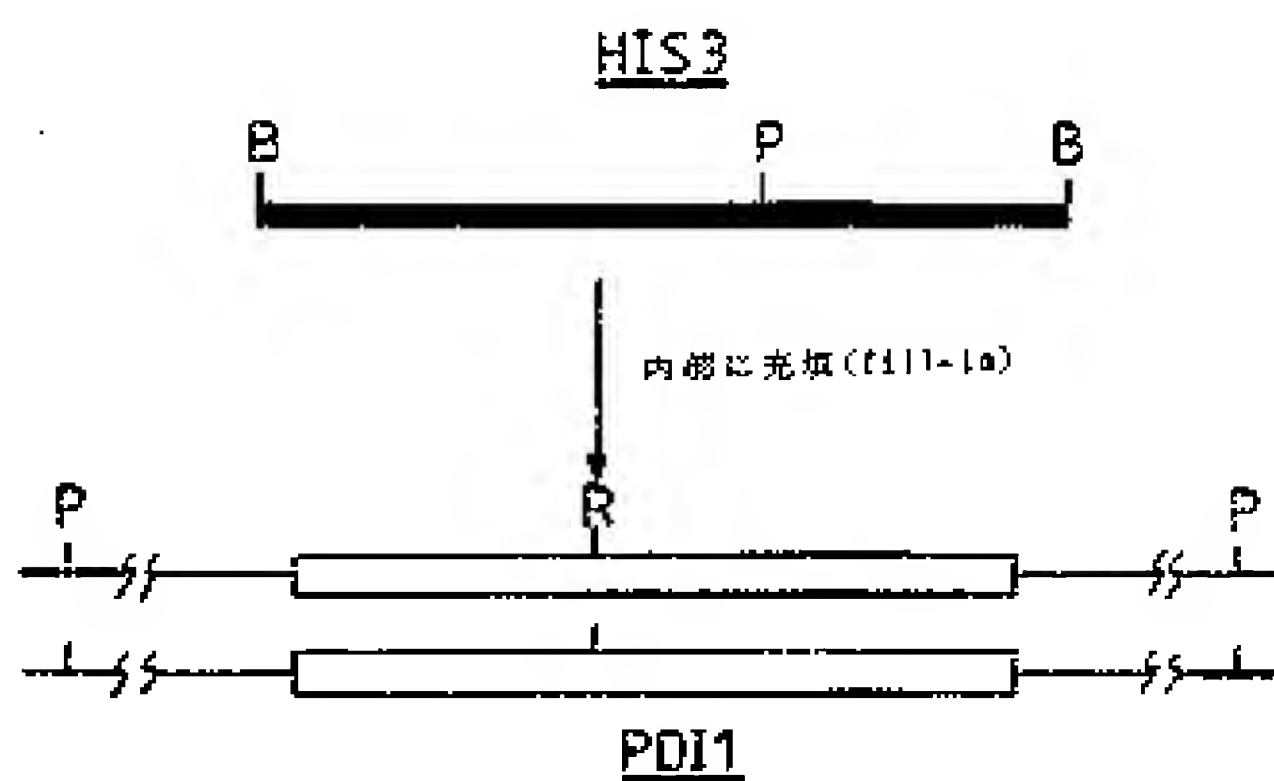


FIG. 3a

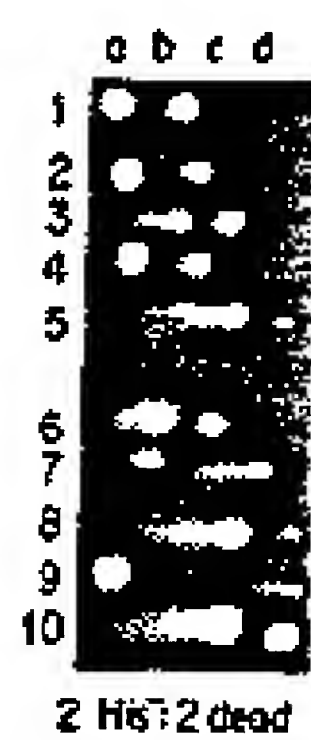


FIG. 3b

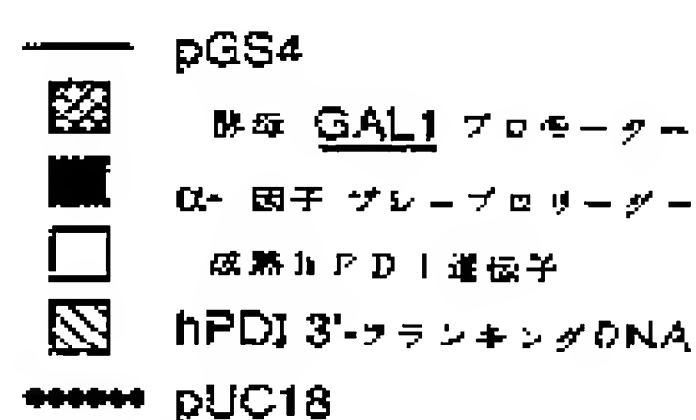
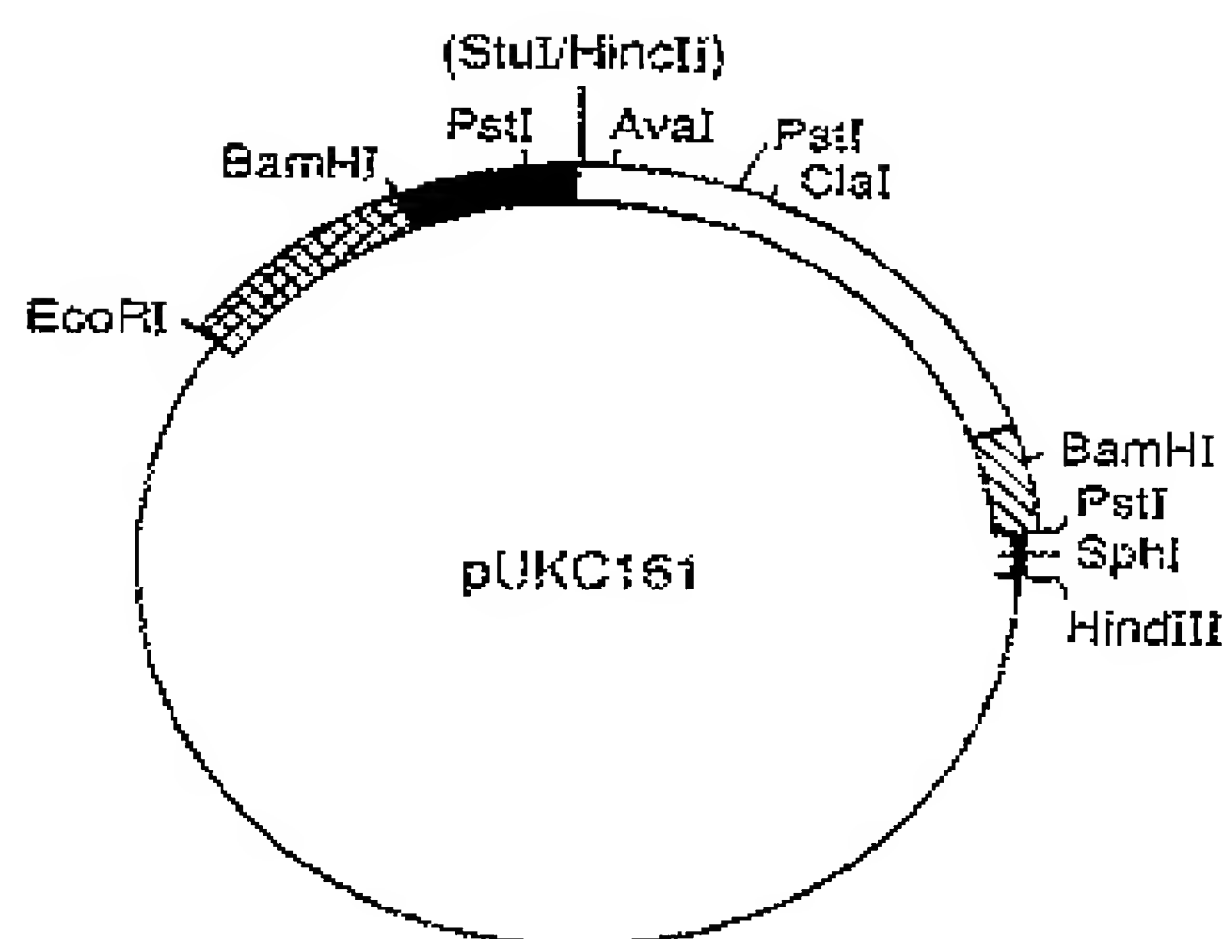


FIG. 4

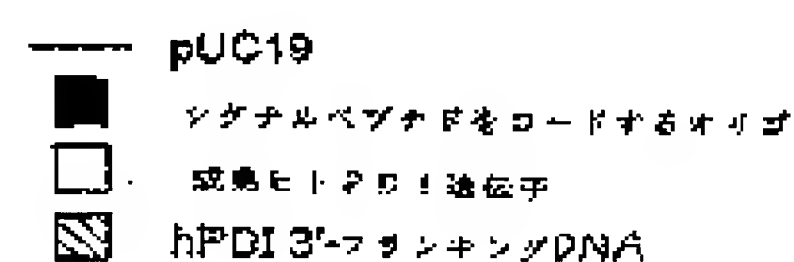
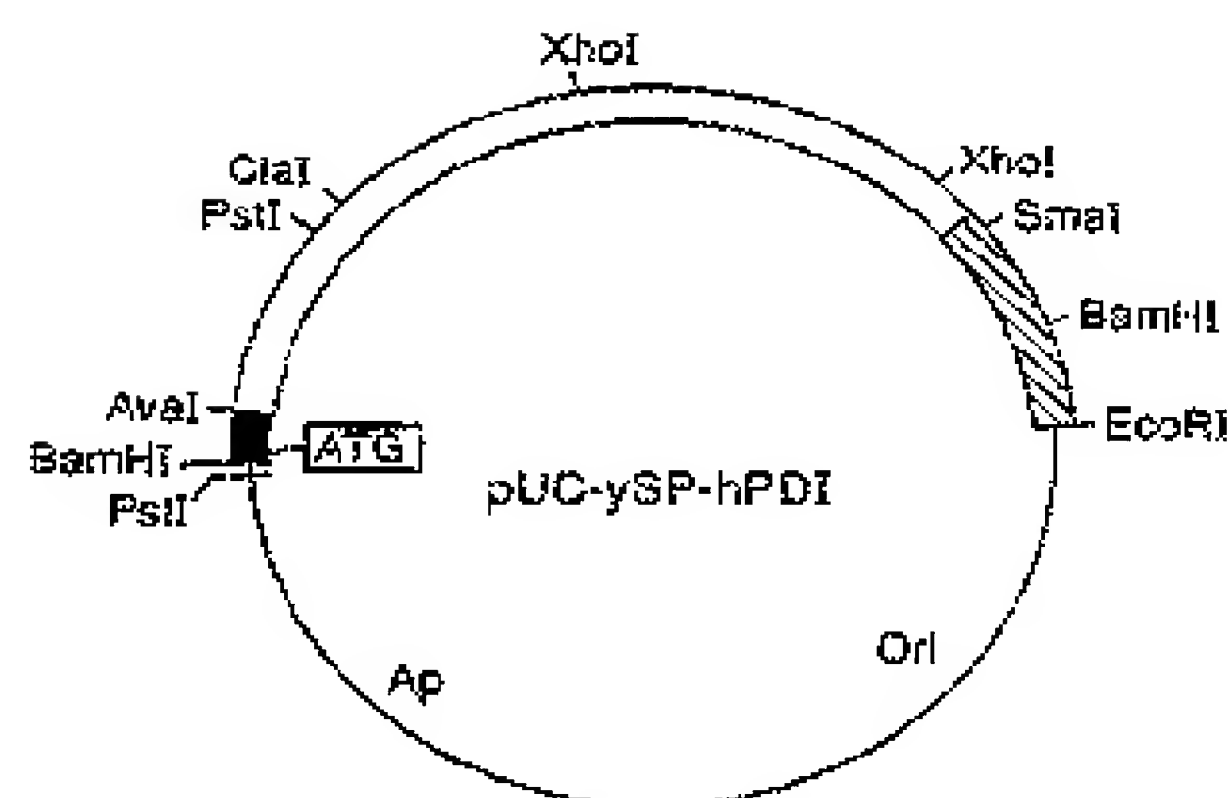


FIG. 5

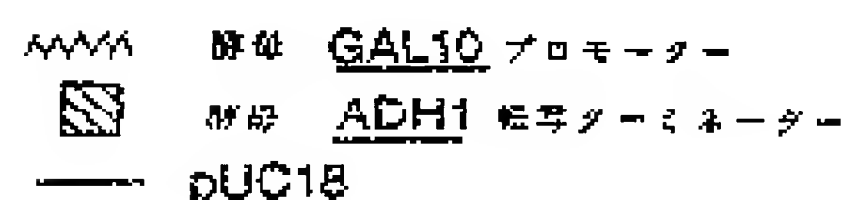
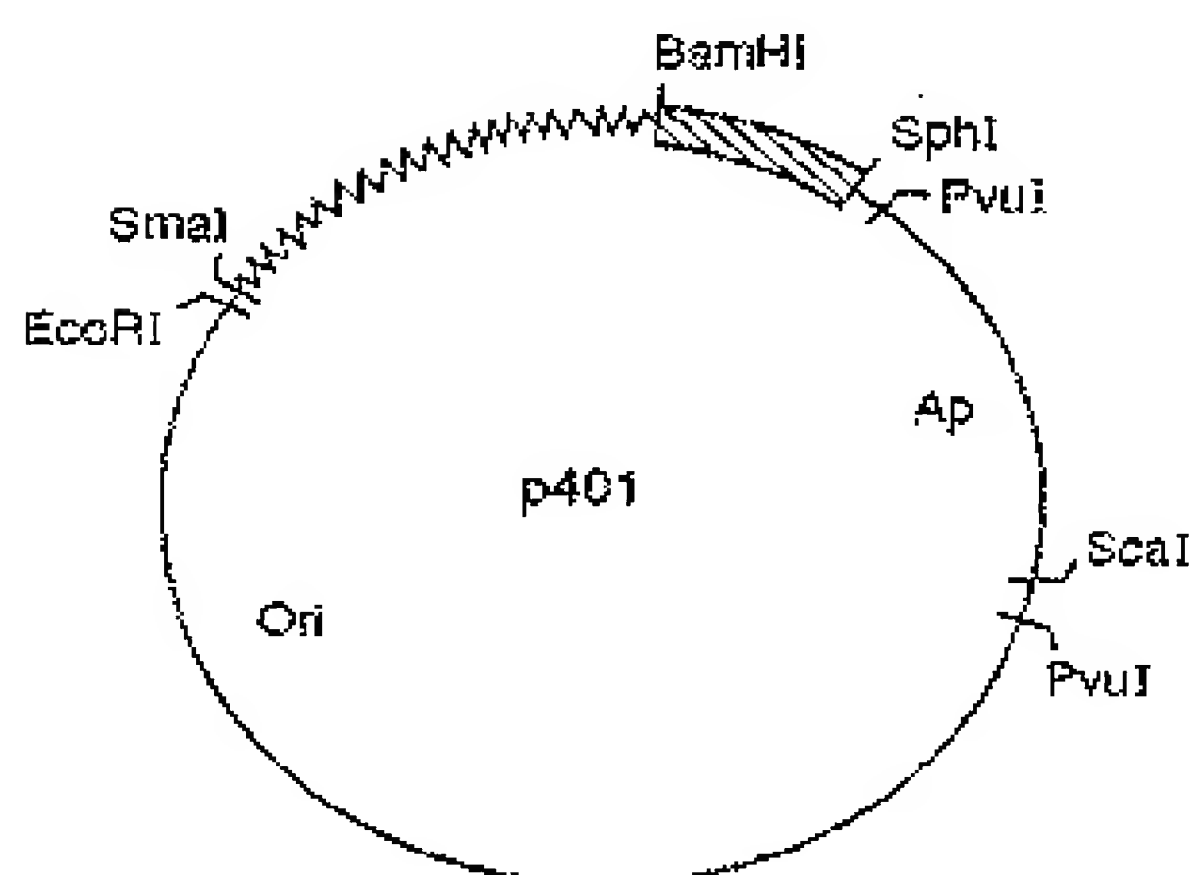


FIG. 6

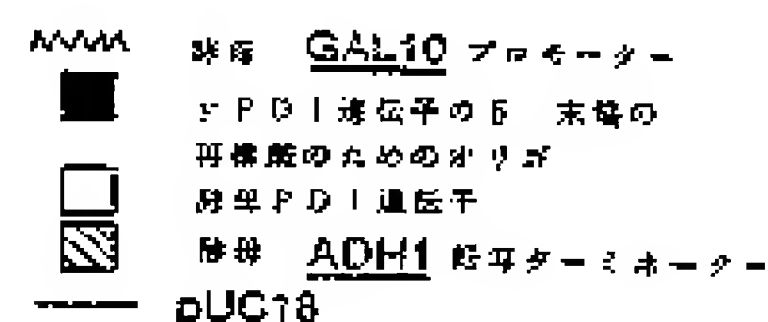
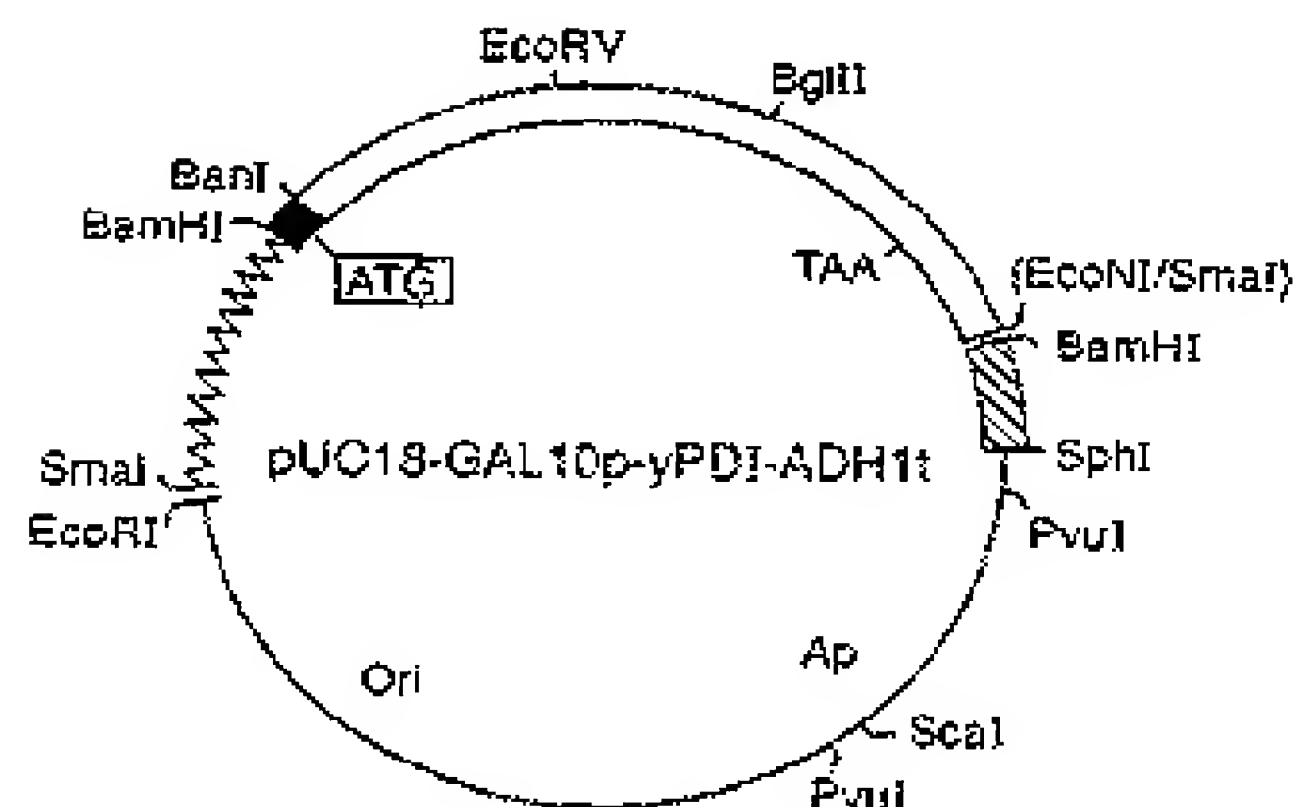


FIG. 7

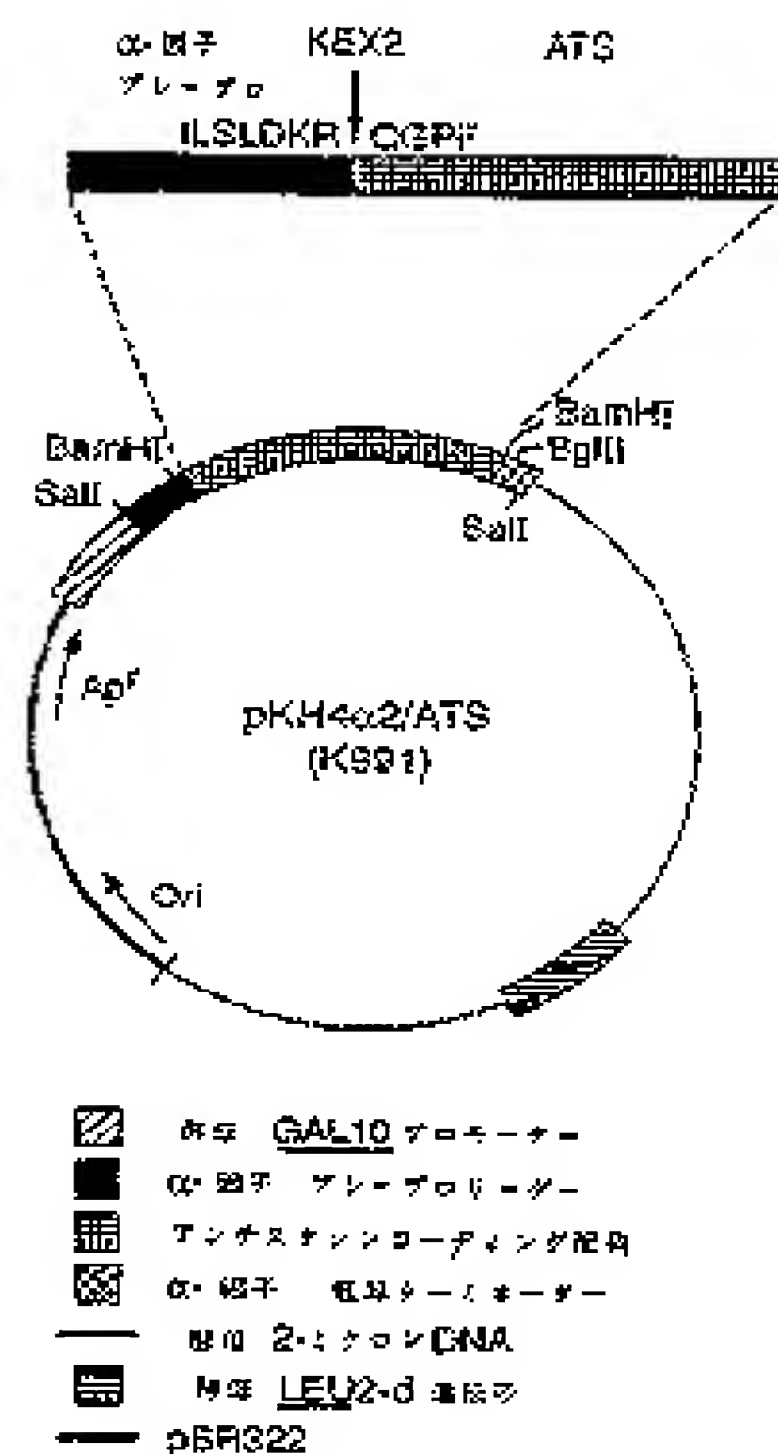


FIG. 8

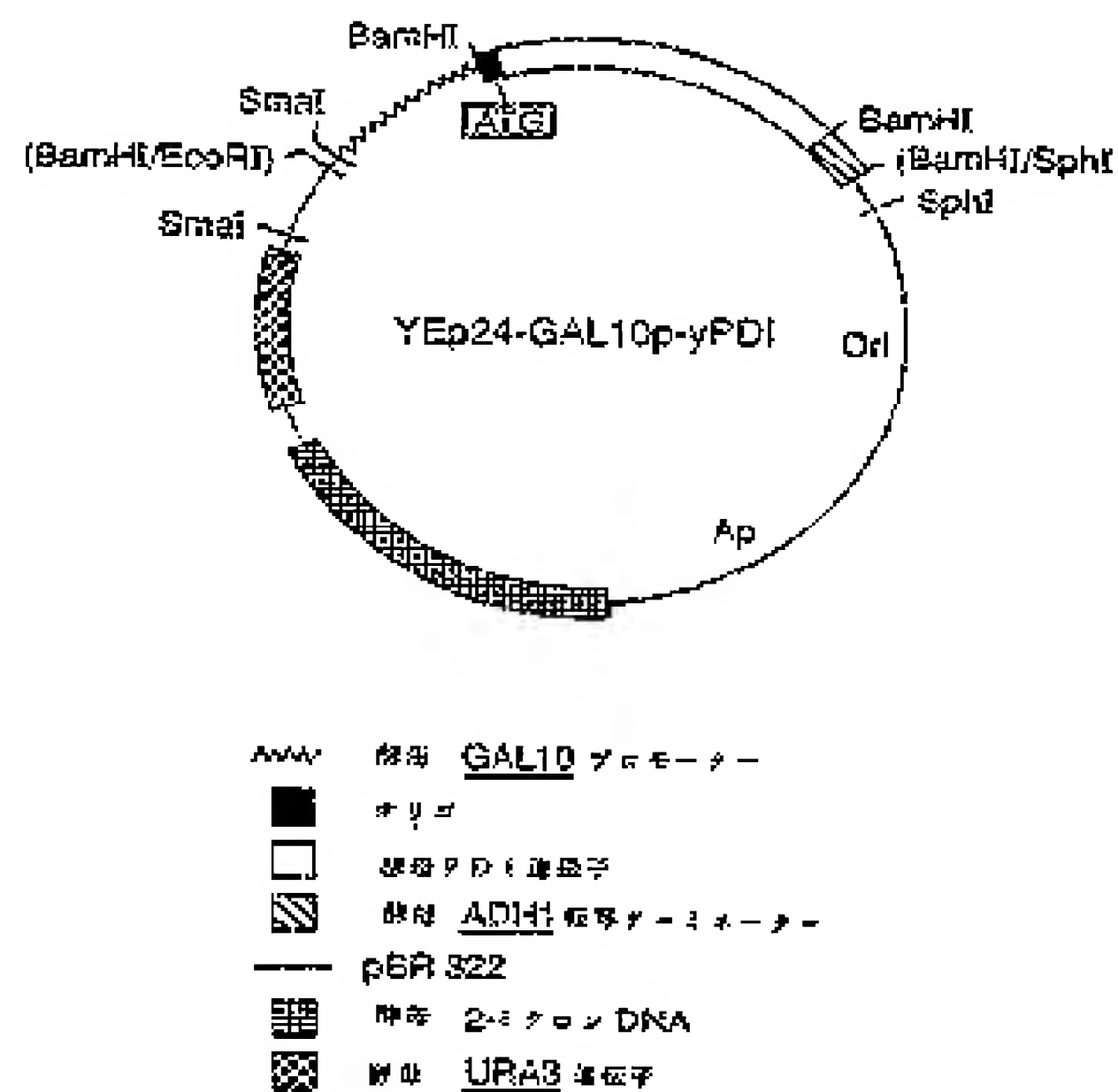


FIG. 9

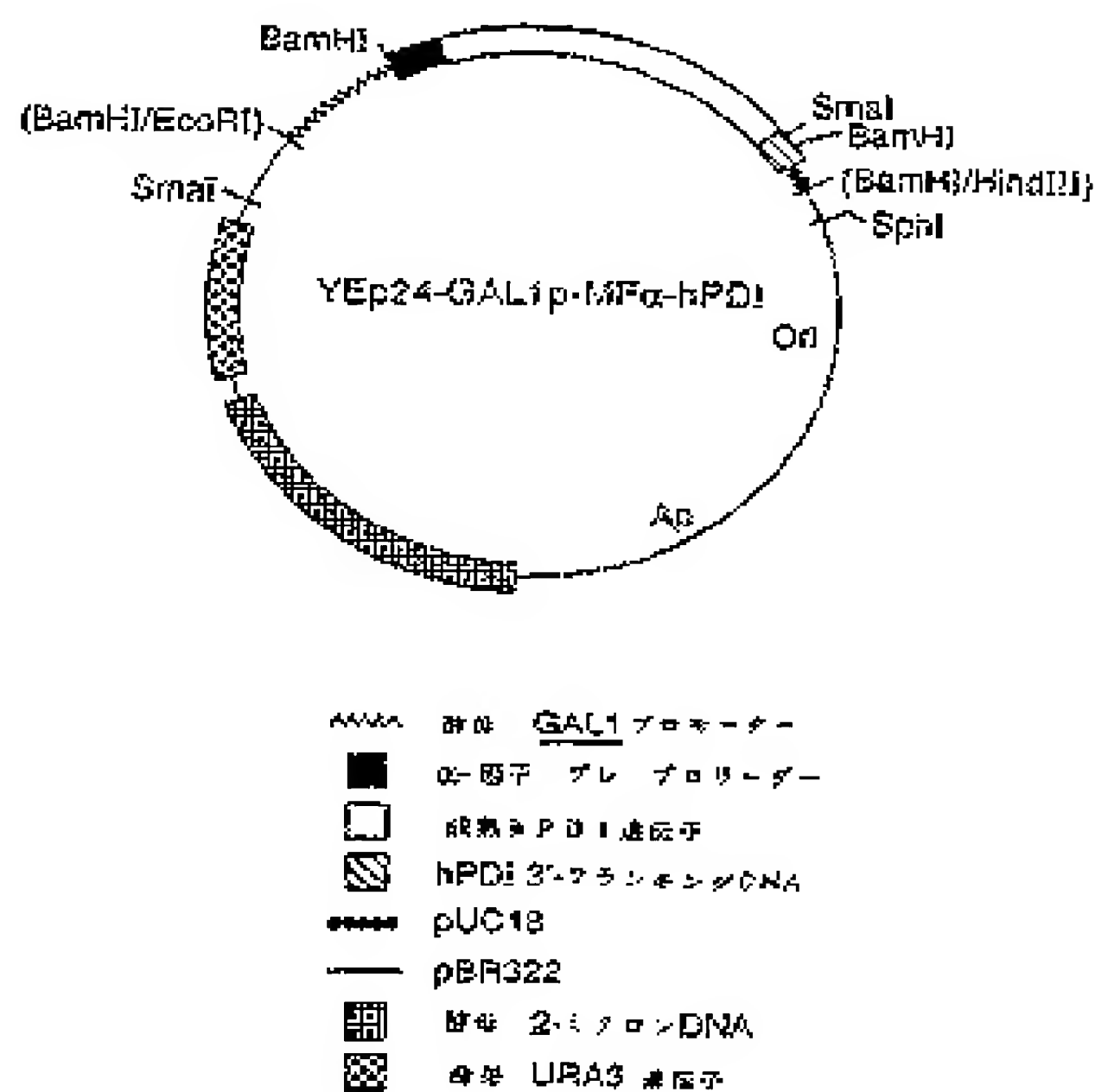


FIG. 10

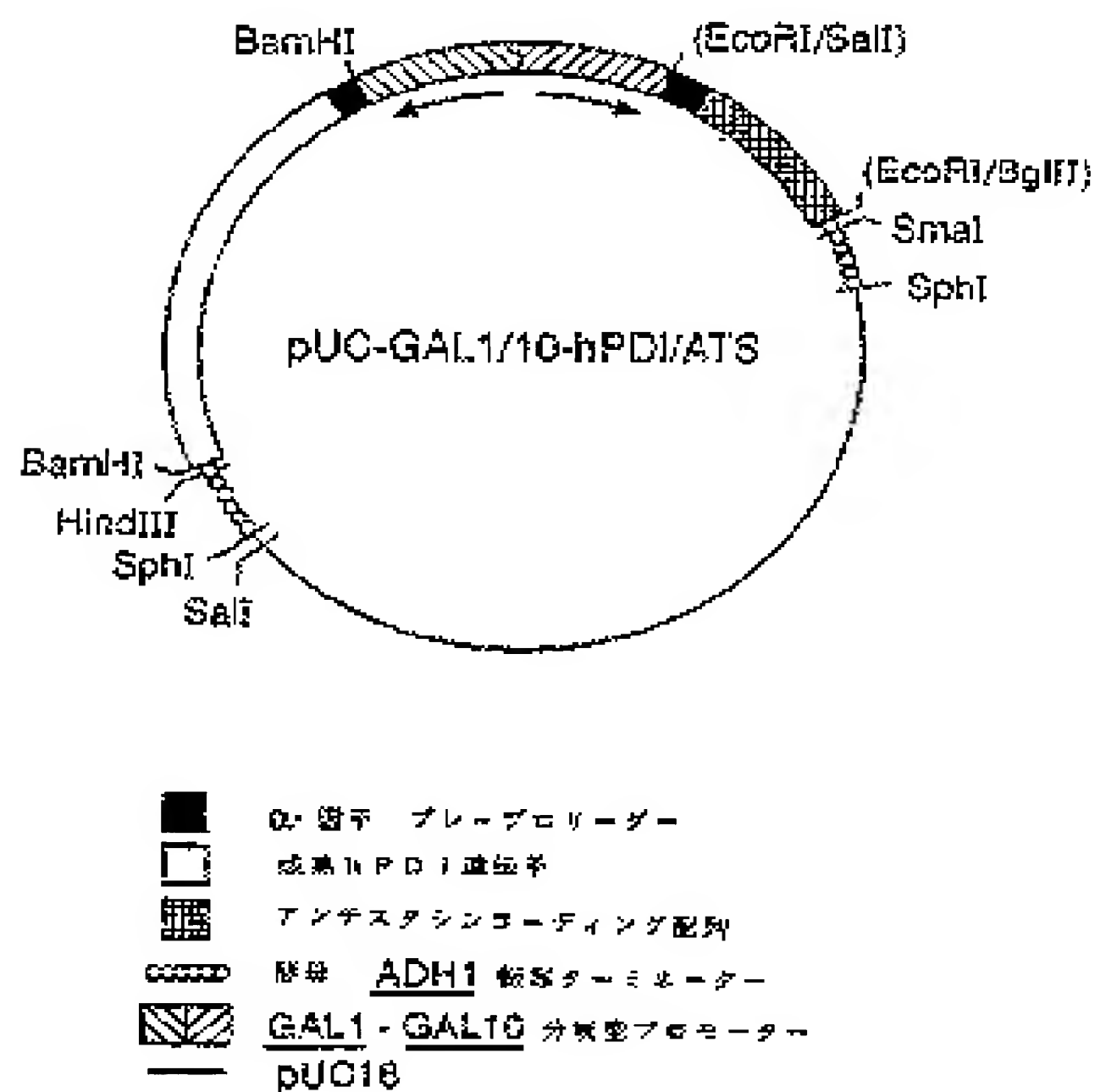


FIG. 11

フロントページの続き

(51) Int. Cl. 6

識別記号

序内整理番号

F I

// (C 1 2 P 21/92

C 1 2 R 1:865)

(C 1 2 N 1/19

C 1 2 R 1:865)

(C 1 2 N 9/90

C 1 2 R 1:865)

(81) 指定国 EP(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AU, BB, BG, BR, CA, CZ, FI, HU, JP, KR, KZ, LK, MG, MN, MW, NO, NZ, PL, RO, RU, SD, SK, UA, US

(72) 発明者 トウイート、マイケル・エフ
イギリス国、ケント・シー・デュー・4・
7・エヌ・ビー、チャーナム・ハッチ、サ
イディングイル・クロース・3

(72) 発明者 フリードマン、ロバート・ビー
イギリス国、ケント・シー・デュー・1・
1・エツクス・アール、カンタベリー、セ
ント・オーガスティンズ・ロード・43

(72) 発明者 シェルツ、ローレン・デュー
アメリカ合衆国、ペンシルバニア・19438、
ハーリーズビル、オーク・ドライブ・421

(72) 発明者 エリス、ロナルド・ダブリュ
アメリカ合衆国、ペンシルバニア・19066、
メリオン、シカモア・アベニュー・206

(72) 発明者 マークス、ヘンリー・ゼット
アメリカ合衆国、ペンシルバニア・19095、
ウインコート、ソーンベリー・ロード・
1517

(72) 発明者 モンゴメリー、ドナ・エル
アメリカ合衆国、ペンシルバニア・18914、
デヤルフオント、ヒツコリー・レーン・9